

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Effets de la L-Arginine sur le développement de la néphropathie aux acides aristolochiques dans un modèle murin

Furdelle, Caroline

Award date:
2016

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**EFFETS DE LA L-ARGININE SUR LE DEVELOPPEMENT DE LA
NEPHROPATHIE AUX ACIDES ARISTOLOCHIQUES DANS UN MODELE MURIN**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Caroline FURDELLE

Janvier 2016

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Effets de la L-Arginine sur le développement de la néphropathie aux acides aristolochiques dans un modèle murin

FURDELLE Caroline

Résumé

La néphropathie aux acides aristolochiques (NAA) est une atteinte rénale tubulo-interstitielle progressive induite par une intoxication aux acides aristolochiques (AA). L'évolution de cette pathologie est caractérisée par l'interconnection de deux phases, aiguë et chronique. Au cours de la NAA, une diminution de la biodisponibilité en monoxyde d'azote (NO) a été identifiée. Au vu des multiples fonctions de ce facteur paracrine dans le tissu rénal, une réduction de sa production pourrait jouer un rôle dans l'apparition des dommages rénaux. Lors d'une étude précédente, nous avons montré que rétablir la biodisponibilité en NO via un traitement à la L-Arginine (L-Arg), le substrat de synthèse du NO, pouvait améliorer l'insuffisance rénale aiguë induite par une intoxication aux AA. Dès lors, au cours de ce mémoire, nous avons étudié l'effet de ce même traitement à la L-Arg dans un modèle d'intoxication aux AA chez la souris, en ciblant plus particulièrement la phase chronique. L'objectif de ce travail consiste à déterminer l'influence bénéfique potentielle d'un apport en L-Arg au cours de la transition de la phase aiguë à la phase chronique de la NAA.

Pour ce faire, des souris mâles C57BL/6J ont été réparties de manière aléatoire dans plusieurs groupes expérimentaux. Les souris ont reçu des injections quotidiennes de AA (3.5 mg/kg) pendant 4 jours et certaines d'entre elles ont été traitées avec de la L-Arg (5% en eau de boisson). Les animaux ont été euthanasiés 5 (J5), 10 (J10) ou 20 (J20) jours après le début du protocole, afin de récolter les échantillons à analyser.

Comme rapporté dans la littérature, les souris traitées aux AA présentent une diminution de la biodisponibilité en NO. En outre, l'évaluation de la fonction rénale a montré une polyurie, une diminution de l'osmolarité urinaire ainsi qu'une protéinurie. Une augmentation de la concentration plasmatique en créatinine et en urée a également été observée dès le J10. Les analyses histologiques des reins de souris traitées aux AA ont révélé le développement de lésions rénales caractérisant la phase aiguë au J5 et la phase chronique au J20, ainsi que l'apparition d'un processus inflammatoire. De plus, à partir du J10, les zones renfermant des tubules endommagés présentaient également une fibrose interstitielle. Les résultats obtenus pour chaque timing chez les souris traitées aux AA, ainsi qu'avec de la L-Arg, ont montré une augmentation de la biodisponibilité en NO, ainsi qu'une amélioration de paramètres rénaux tels que la diurèse et l'osmolarité. En outre, les dommages tubulaires et la fibrose interstitielle étaient atténués. Ces données suggèrent que le NO joue un rôle crucial lors de la transition de la phase aiguë à la phase chronique dans la NAA et qu'une augmentation de sa biodisponibilité permet de limiter les atteintes néphrotoxiques dans le modèle de NAA chez la souris.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2016

Promoteur: N. Caron

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Nathalie Caron pour m'avoir donné l'opportunité de pouvoir travailler dans son laboratoire ainsi que pour le temps qu'elle a consacré à mon travail et pour ses conseils.

Je remercie les membres de mon jury, Mesdames Kirschvink, Puissant, Wauthy et Monsieur Jadot pour leur participation à l'évaluation de ce travail.

Je souhaite adresser mes plus grands remerciements à Inès Jadot pour toute l'aide qu'elle m'a apporté au cours de ce mémoire, pour sa patience et toutes les heures qu'elle a consacré à corriger mon travail. Ses nombreux conseils m'ont permis d'évoluer dans ma formation. Je remercie également Vanessa Colombaro pour ses nombreux conseils, ses encouragements et ses petites anecdotes qui m'auront bien fait rire. Merci à Blanche Martin qui m'a également aidé dans ma formation en répondant à mes nombreuses questions. Merci aussi pour le temps que tu as consacré à la correction de mon travail. Merci à Isabelle Habsch qui a pris le temps de me former à de nombreuses techniques et cela toujours dans la bonne humeur. Sans oublier Olivia Botton, merci beaucoup pour tes encouragements et pour m'avoir aidé à compléter ma formation en fin de mémoire. Enfin, merci à Lucie Burette qui illumine le laboratoire avec ses fous rires et sa joie de vivre. Un tout grand merci les filles pour m'avoir accueillie chaleureusement dans votre équipe. J'aurai passé de bons moments en votre compagnie. Cette année passée avec vous restera une période importante dans ma vie.

Je remercie tous mes petits camarades de BBMC pour tous les bons moments passés à vos côtés qui m'ont permis de tenir le coup dans les moments les plus difficiles du mémoire.

Finalement, je tiens à remercier de tout cœur ma famille et Christophe pour leur amour, leur soutien, leur encouragement et leur générosité. Ils ont su m'inculquer le goût de la connaissance et le don de la persévérance. Merci mille fois !!!

LISTE DES ABREVIATIONS

%	Pourcent
μmol	Micromole
α-SMA	Alpha smooth muscle actin
AA	Acides aristolochiques
AChE	Acétylcholinestérase
ADMA	Diméthyl-arginine asymétrique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BH ₄	Tétrahydrobioptérine
CA ²⁺	Calcium
Cl ⁻	Chlore
Col I	Collagène de type I
Col III	Collagène de type III
Col IV	Collagène de type IV
Cre	Créatinine
CTL	Contrôle
dA-AAI	7 désoxy-adénosine-N ⁶ yl aristolactame I
dA-AAII	7 désoxy-adénosine-N ⁶ yl aristolactame II
DAB	3'-diaminobenzidine
dG-AAI	7 désoxy-guanosine-N ² yl aristolactame I
dl	Décilitre
eNOS	Oxyde nitrique synthase endothéliale
ET-1	Endothéline-1
FDA	Food and Drug administration
FMN	Flavine mononucléotide

g	Gramme
GCs	Guanylate cyclase soluble
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
h	Heures
HCl	Acide chlorhydrique
HCO ₃ ⁻	Bicarbonate
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor-1 alpha
HRP	Horseradish peroxidase
IHC	Immunohistochimie
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
Ip	Intrapéritonéale
ISOM	Inner stripe of the outer medulla
l	Litre
IL-1 β	Interleukine-1 β
IL-6	Interleukine-6
J	Jour
K ⁺	Potassium
kg	Kilogramme
L-Arg	L-Arginine
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginine méthyle ester
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	Monocyte Chemoattractant protein-1
mg	Milligramme
ml	Millilitre
mmol	Millimole
MMP-2	Matrix metalloproteinase-2
mOsm	Milliosmole
NAA	Néphropathie aux acides aristolochiques
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NAG	N-acétyl- β -D-glucosaminidase
Na ⁺	Sodium
NaCl	Chlorure de Sodium
NEB	Néphropathie endémique des Balkan
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
nm	Nanomètre
nNOS	Oxyde nitrique synthase neuronale
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Oxyde nitrique synthase
NOx	Nitrate/Nitrite
O ₂	Oxygène
ONOO ⁻	Peroxynitrite
OATs	Organic anions transporters
ON	Over Night
OSOM	Outer stripe of the outer medulla
PAS	Periodic acid schiff
PBS	Tampon phosphate salin
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PO ₄ ³⁻	Phosphate
PTECs	Cellules épithéliales des tubules proximaux
qRT-PCR	PCR quantitative en temps réel
rpm	Tour par minute
SEM	Standard error of the mean
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF- β 1	Transforming growth factor-beta1
UI	Unité Internationale
VEGF	Vascular endothelial growth factor

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

1. Le rein : structure et fonctions.....	1
1.1 Anatomie.....	1
1.2 Fonctions.....	5
1.3 Physiopathologie.....	5
2. Néphropathie aux Acides Aristolochiques.....	6
2.1 Généralités.....	6
2.2 Cytotoxicité des AA.....	8
2.2.1 Carcinogénèse.....	8
2.2.2 Néphrotoxicité.....	10
2.3 Compartiment vasculaire.....	11
2.4 Modèles expérimentaux de la NAA.....	12
3. Monoxyde d'Azote.....	12
3.1 Généralités.....	12
3.2 Synthèse du NO.....	12
3.3 Fonctions du NO dans le rein.....	14
3.4 Pharmacothérapie.....	15
4. Objectifs du travail.....	15

MATERIEL ET METHODES

1. Protocole expérimental.....	16
1.1 Animaux.....	16
1.2 Traitements.....	16
1.3 Protocole.....	17
2. Analyse des échantillons biologiques.....	18
2.1 Mesure de l'osmolarité urinaire.....	18
2.2 Quantification de la protéinurie.....	18
2.3 Concentration plasmatique et urinaire en créatinine.....	18
2.4 Concentration plasmatique en urée.....	19

2.5 Concentration urinaire en Nitrates/Nitrites.....	19
2.6 Concentration urinaire en GMPc.....	19
2.7 Analyses histologiques et immunohistologiques.....	20
2.7.1 Prétraitement.....	20
2.7.2 Colorations.....	20
2.7.3 Immunohistochemie.....	21
2.8 PCR quantitative en temps réel.....	22
2.8.1 Extraction d'ARN.....	22
2.8.2 Traitement à l'ADNase.....	22
2.8.3 RT-PCR.....	22
2.8.4 qRT-PCR.....	22
3. Analyses statistiques.....	23

RESULTATS

1. Partie 1 : Etude des effets de la L-Arg en conditions contrôles.....	24
1.1 Mesure de la biodisponibilité en NO.....	24
1.2 Données métaboliques.....	25
1.3 Fonction rénale.....	26
1.4 Analyses histologiques.....	26
2. Partie 2 : Etude des effets de l'administration de L-Arg dans la phase chronique de la NAA.....	28
2.1 Mesure de la biodisponibilité en NO.....	28
2.2 Données métaboliques.....	29
2.3 Fonction rénale.....	29
2.4 Caractérisation des lésions tubulaires et de la prolifération cellulaire.....	31
2.4.1 Analyses histologiques.....	31
2.4.2 Evaluation du processus de prolifération cellulaire.....	33
2.5 Caractérisation de l'inflammation.....	34
2.6 Analyse du développement de la fibrose.....	35

DISCUSSION

1. Partie 1 : Etude des effets de la L-Arg en condition contrôle..... 40
2. Partie 2 : Etude des effets de l'administration de L-Arg dans la phase chronique de la NAA..... 41
3. Conclusion et perspectives..... 47

BIBLIOGRAPHIE

Introduction

1. Le rein : structure et fonctions

1.1. Anatomie

Chez l'homme, les reins sont situés au niveau des fosses lombaires, en position rétropéritonéale. Ils présentent une face convexe latérale ainsi qu'une concavité, le hile, où se concentrent les vaisseaux sanguins, les nerfs et l'uretère. La perfusion du tissu est assurée par l'artère rénale qui se subdivise en un réseau vasculaire complexe. Les reins ont pour fonction majeure d'assurer la filtration du plasma et d'élaborer l'urine finale grâce à de nombreux systèmes de transport soumis à diverses régulations. L'uretère, qui draine le bassinet, évacue ensuite l'urine jusqu'à la vessie où elle est stockée jusqu'à ce qu'elle soit excrétée (**Figures 1 et 2**) (Raven et al, 2007; Marieb et Hoehn, 2013).

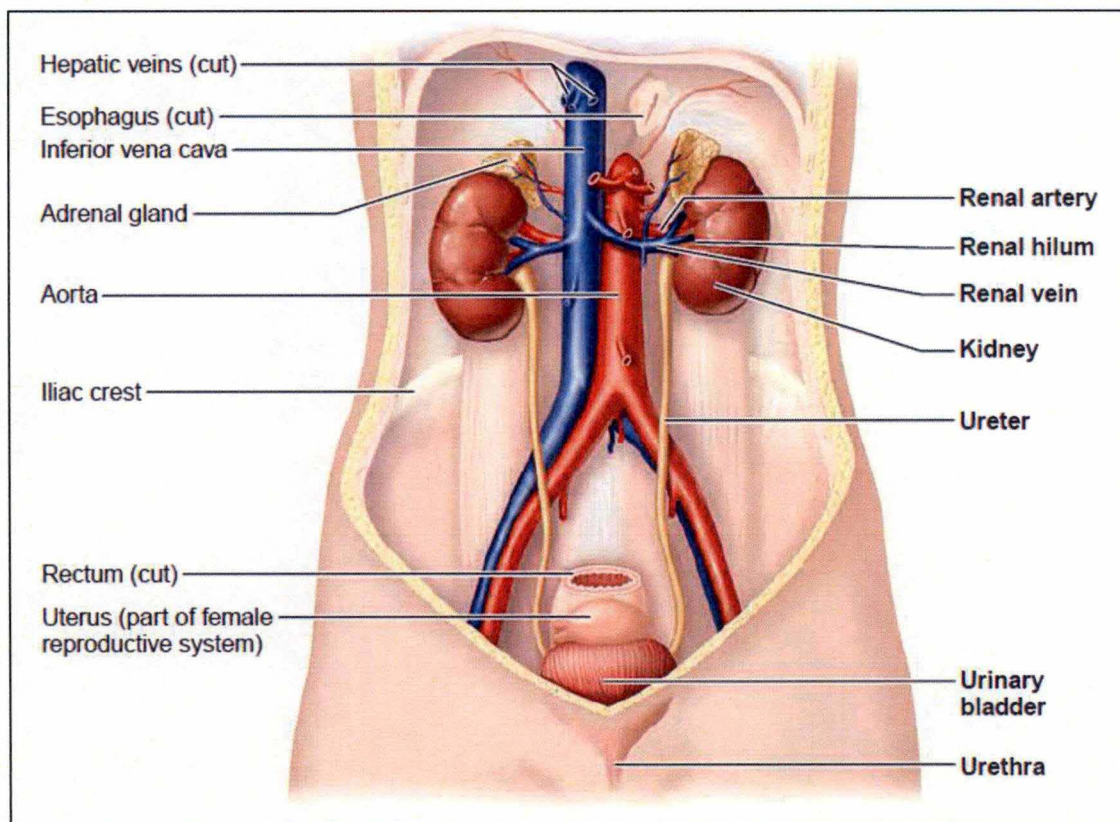


Figure 1 : Représentation anatomique du système urinaire, vue antérieure (Marieb et Hoehn, 2013).

Le tissu rénal est entouré d'une capsule fibreuse et est constitué de plusieurs zones, la plus externe correspondant au cortex et la plus interne à la médulla, qui se subdivise en médulla externe et interne. Il est à noter que la médulla externe est elle-même subdivisée en deux parties : l'une externe (OSOM: outer stripe of the outer medulla) et l'autre interne (ISOM: inner stripe of the outer medulla) (**Figure 2**) (Vander, 1995).

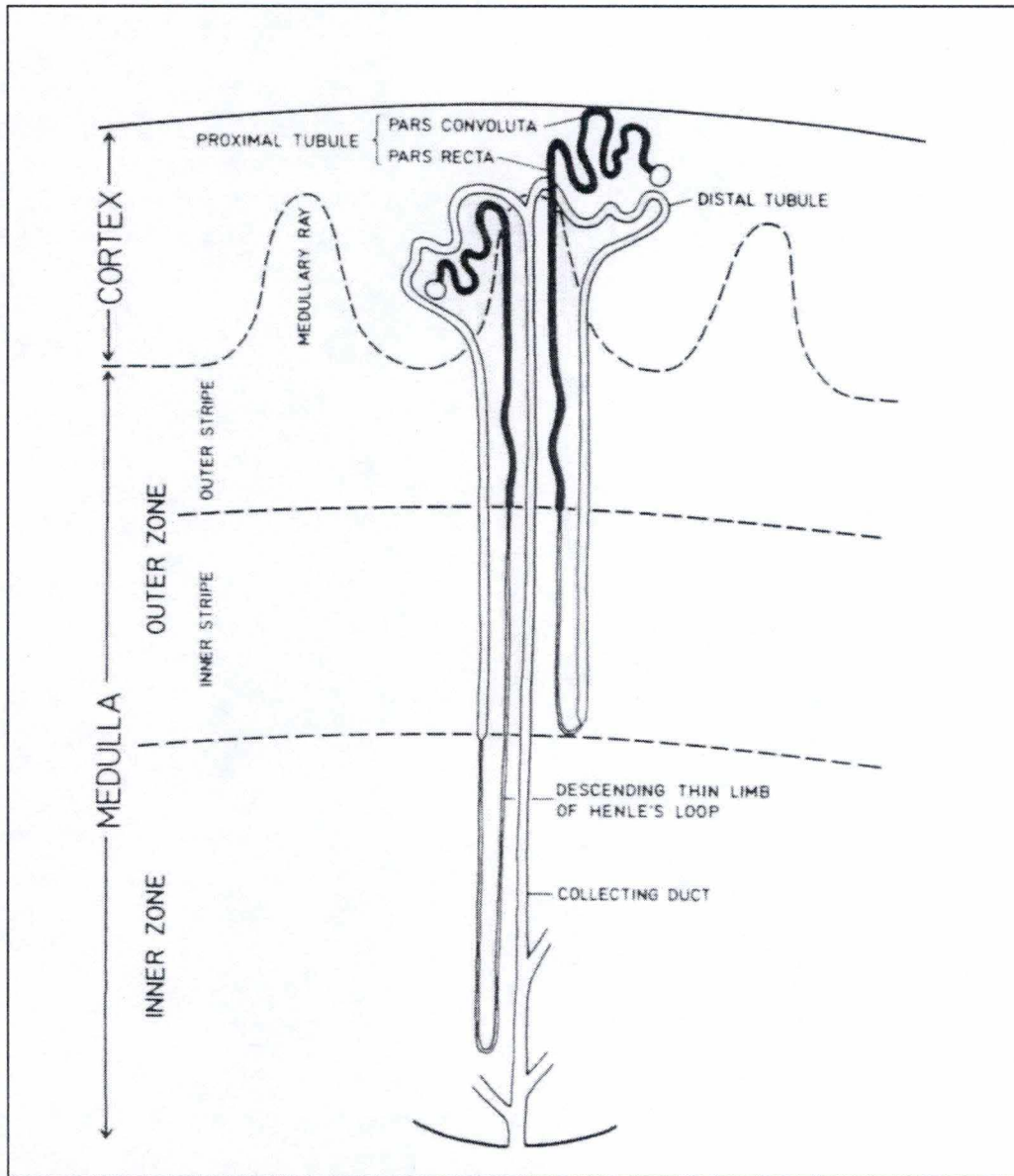


Figure 2 : Schéma illustrant les différentes subdivisions du rein ainsi que les deux types de néphrons : corticaux et juxta-médullaires, selon leur localisation dans les différentes zones du rein et leur morphologie (Maunsbach et al, 1992).

L'unité fonctionnelle du rein est le néphron, chaque rein en contient environ un million. Il en existe de deux types : les néphrons juxta-médullaires, dont l'anse de Henle descend profondément dans la médulla, et les néphrons corticaux, qui à l'inverse possèdent une anse de Henle courte, peu profonde (**Figure 2**). De plus, ils sont constitués de deux pôles morpho-fonctionnels, vasculaires et tubulaires : d'une part le pôle glomérulaire entouré par la capsule

de Bowman (composée d'un feuillet viscéral et pariétal) et localisé dans le cortex, et d'autre part le pôle tubulaire rénal constitué de différents segments.

Le glomérule se compose d'un réseau de capillaires spécialisés issus de l'artériole afférente. Ce réseau de capillaires glomérulaires est entouré par une couche de cellules épithéliales, les podocytes, qui forment le feuillet viscéral de la capsule de Bowman. Ensemble, la capsule de Bowman et le glomérule forment le corpuscule de Malpighi. La fonction principale du glomérule est l'ultrafiltration du plasma au travers des capillaires glomérulaires. Pour ce faire, le filtrat doit traverser la couche de cellules endothéliales présentant de nombreux pores, une membrane basale, et finalement les fentes de filtration situées entre les pédicelles des podocytes. L'eau, les protéines de petite taille ainsi que les petites molécules peuvent librement passer cette barrière de filtration, à l'inverse des cellules sanguines et des protéines plasmatiques. Par conséquent, ce qui n'est pas filtré ressort du glomérule par une artériole efférente qui rejoint un vaste réseau de capillaires péri-tubulaires (pour les néphrons corticaux) ou de vasa recta (pour les néphrons juxta-médullaires). Ces capillaires ont pour rôle d'assurer les besoins métaboliques des cellules tubulaires ainsi que de récupérer ce qui a été absorbé par les tubules. En outre, certaines substances n'ayant pas été filtrées dans le glomérule peuvent être acheminées des capillaires aux tubules pour être secrétées dans l'urine en formation (Valtin, 1983; Silverthorn et al, 2007; Lacour, 2013).

Le tubule fait suite au corpuscule de Malpighi. Le liquide filtré s'écoule tout d'abord dans le tubule proximal contourné, puis s'ensuit l'anse de Henle qui s'enfonce dans la médullaire avant de remonter dans le cortex. L'anse de Henle est divisée en deux parties : d'une part, une branche « descendante » étroite et d'autre part, une branche « ascendante » comprenant une partie étroite et une partie large. Ensuite le filtrat s'écoule dans le tubule distal contourné pour enfin aboutir dans le canal collecteur qui descend dans la médullaire et parvient au bassinet où le liquide filtré devient l'urine définitive (**Figure 3**) (Valtin, 1983; Silverthorn et al, 2007; Lacour, 2013).

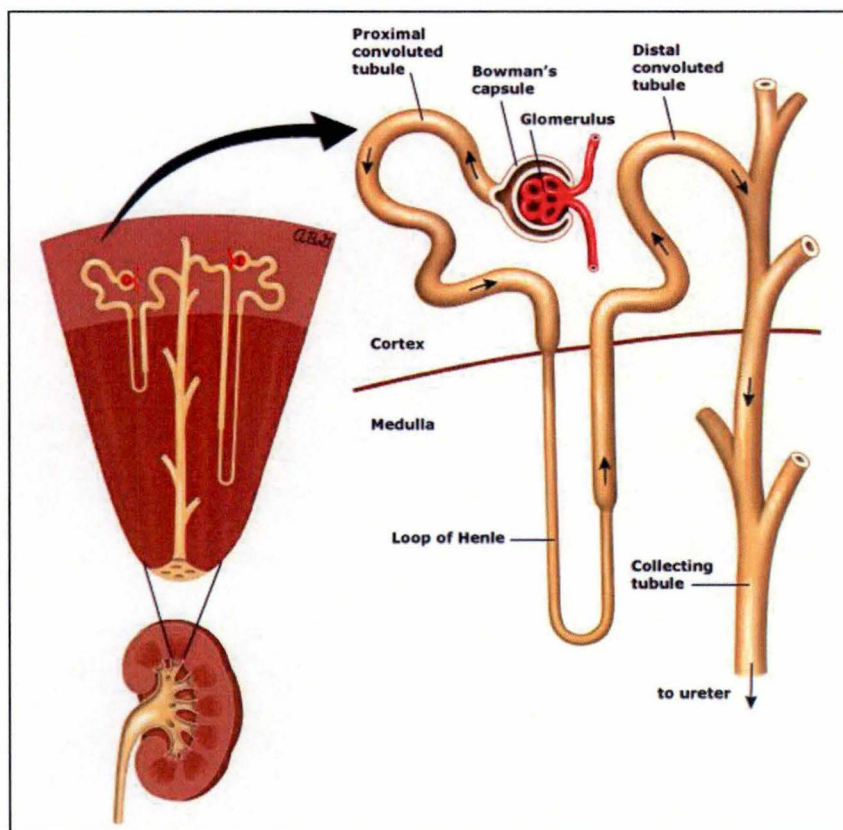


Figure 3 : Illustration anatomique du néphron

(http://stage0www.uptodate.com/contents/image?imageKey=PI/82497&topicKey=PI%2F4419&source=outline_link).

Dans le cadre de notre étude, nous avons apporté une attention particulière au tubule proximal qui, au vu de ses nombreuses propriétés, est fortement vulnérable à la néphropathie aux acides aristolochiques. Ce segment tubulaire, en contact direct avec l'espace de Bowman, est divisé en deux sections : la première partie est dite « contournée » tandis que la portion terminale est « droite ». En outre, on distingue dans le tubule proximal plusieurs segments: S1, S2 et S3 ayant des fonctions différentes. Les cellules épithéliales du tubule proximal ont une particularité qui permet de les distinguer des autres cellules tubulaires : la présence d'une bordure en brosse qui fait protrusion dans la lumière des tubules. Cette caractéristique a pour but d'augmenter la surface cellulaire apicale et par conséquent, de favoriser les échanges. En effet, le tubule proximal est à l'origine de la réabsorption d'environ 60% de l'ultrafiltrat glomérulaire. Il réabsorbe notamment les ions suivants : Na^+ , HCO_3^- , Cl^- , K^+ , CA^{2+} , PO_4^{3-} , ainsi que l'eau et les solutés organiques comprenant notamment le glucose et les acides aminés. Ce mécanisme de réabsorption est facilité par des systèmes de transports actifs et passifs. La principale force motrice de la réabsorption est le transport actif du Na^+ via la pompe Na^+/K^+ -ATPase, qui favorise ainsi le transport de molécules contre leur gradient électrochimique. Par la même occasion, un gradient osmotique est créé et permet la réabsorption de l'eau qui se déplace du compartiment le moins concentré en soluté vers le plus concentré (Amoueian et Attaranzadeh, 2012).

1.2. Fonctions

Le rein est un organe vital qui assure la filtration du plasma afin de garantir les fonctions suivantes :

- Eliminer les déchets métaboliques incluant l'urée, l'acide urique, la créatinine, le produit final de la dégradation de l'hémoglobine et les métabolites de nombreuses hormones, sans oublier l'excrétion urinaire de toxines et de substances exogènes telles que les médicaments.
- Il permet aussi la régulation du volume du liquide extracellulaire en contrôlant par la même occasion la pression artérielle. Dès lors, le rein, en coopération avec le système cardiovasculaire, doit maintenir un équilibre en fonction des demandes. Pour y parvenir, le rein contrôle l'élimination du sel et de l'eau par réabsorption.
- En outre, il travaille aussi pour maintenir l'équilibre ionique et acido-basique ainsi que pour réguler l'osmolarité du sang.
- Tout comme le foie, il est capable de réaliser la gluconéogenèse et de synthétiser du glucose à partir d'acides aminés et d'autres précurseurs pour ensuite le libérer dans le sang.
- Enfin, parmi ses nombreuses fonctions, l'une d'entre elles est de sécréter des hormones, en particulier trois types: la rénine qui contrôle la production d'hormones impliquées dans l'homéostasie du Na^+ et le contrôle de la pression artérielle, l'érythropoïétine connue pour réguler la production des globules rouges et la 1,25-dihydroxyvitamine D_3 , la forme active de la vitamine D qui régule l'équilibre du Ca^{2+} (Vander, 1995; Silverthorn et al, 2007).

1.3. Physiopathologie

Comme décrit précédemment, le rein est un organe essentiel au sein de l'organisme en raison des multiples fonctions qu'il exerce. Dès lors, un dysfonctionnement de cet organe impliquant une variété d'étiologies affecte de nombreux processus. Les lésions rénales peuvent être dues à des infections rénales, une ischémie se manifestant par des perturbations au niveau vasculaire ou encore à une contamination par des toxines. Par ailleurs, les atteintes rénales peuvent mener à une insuffisance rénale caractérisée par une perte des cellules épithéliales tubulaires par apoptose ou nécrose et des dommages au sein des cellules endothéliales avec pour conséquence une altération du flux sanguin. En outre, une diminution de l'apport en oxygène a un impact important sur l'intégrité des cellules épithéliales. Une diminution progressive du nombre de néphrons fonctionnels est alors observée. Les reins ne sont donc plus capables de filtrer le plasma correctement, menant à une diminution du débit de filtration glomérulaire (Bonventre, 2008; Chawla et Kimmel, 2012). La physiopathologie rénale peut être pré-rénale, intra-rénale ou post-rénale. La première se manifeste par des troubles au niveau du pôle vasculaire des néphrons, tandis que les troubles intra-rénaux font référence à des problèmes au sein des tubules néphrotiques. Pour finir, les dommages post-rénaux impliquent les voies urinaires (Bowman, 2000).

Les atteintes rénales peuvent se manifester sous la forme d'une insuffisance rénale aiguë ou chronique. L'insuffisance rénale aiguë est caractérisée par un déclin rapide des fonctions rénales, reflétée notamment par une nécrose des cellules tubulaires et une diminution du débit de filtration glomérulaire empêchant les reins de maintenir l'homéostasie de l'organisme (Basile et al, 2012). C'est une pathologie qui présente un taux élevé de morbidité et de mortalité. En effet, à long terme et en fonction de la sévérité de la maladie, le risque de développer une insuffisance rénale chronique est élevé, l'état de chronicité étant en général irréversible (Chawla et Kimmel, 2012). L'insuffisance rénale chronique se produit lorsque plus de 70% des néphrons sont détruits. Par la suite, une dialyse ou une transplantation rénale peuvent être nécessaires, on parlera alors d'un avancement de la maladie à un stade terminal (Bowman, 2000).

Les médicaments et les substances toxiques sont à l'origine d'environ 20% des troubles rénaux. De par sa fonction d'élimination des déchets, le rein se retrouve exposé à une grande quantité de toxines. La néphropathie étudiée dans le cadre de ce travail est appelée néphropathie aux acides aristolochiques (NAA) dont l'étiologie n'est autre que la consommation de plantes chinoises contenant une substance toxique, les acides aristolochiques (AA).

2. Néphropathie aux Acides Aristolochiques

2.1. Généralités

La NAA est caractérisée par une insuffisance rénale chronique susceptible de mener à un stade terminal de la maladie. Cette pathologie a été décrite pour la première fois en Belgique en 1992 et diagnostiquée chez des femmes n'ayant pas d'antécédents de pathologie rénale mais ayant toutefois développé une fibrose interstitielle rénale suivie d'une progression de la maladie en phase terminale (Debelle et al, 2009). En outre, chez certaines patientes, la phase chronique de la néphropathie a été associée avec le développement de tumeurs urothéliales (Schmeiser et al, 1996). Il s'est avéré que ces patientes avaient consommé des pilules amaigrissantes à base de plantes chinoises nommées *Stephania Tetrandra* et *Magnolia Officinalis*. Des analyses approfondies ont permis de révéler que ce médicament contenait des AA qui ne sont normalement pas présents dans ces pilules. Il a été découvert que lors de la préparation du médicament, il s'est produit une substitution de *Stephania Tetrandra* par *Aristolochia Fangchi* riche en AA qui sont suspectés d'avoir des effets néphrotoxiques et carcinogènes (Debelle et al, 2009). L'origine de cette confusion entre ces deux plantes était la ressemblance de leurs noms « Pin Yin » en nomenclature chinoise: *Hang Fang Ji* pour *Stephania T.* et *Guang Fang Ji* pour *Aristolochia F.* Cette similitude est due à leurs appartenances à la même famille thérapeutique en médecine traditionnelle chinoise (Debelle et al, 2008).

La Belgique n'est pas le seul pays touché par cette pathologie. En effet, différents cas de NAA ont été répertoriés dans d'autres pays (Figure 4). Cela est dû à l'importante diversité des plantes *Aristolochia*, dont certaines sont suspectées de contenir des AA, qui sont répandues à travers le monde (Gökmen et al, 2013). Il a ainsi été établi que la NAA présentait des caractéristiques cliniques similaires à la néphropathie endémique des Balkans (NEB) dont souffrent des personnes vivant dans des régions localisées à proximité des affluents du Danube

INTRODUCTION

en Bosnie, Bulgarie, Croatie, Roumanie et Serbie (**Figure 5**). La cause de la NEB est de nature environnementale, étant donné que les grains de blé récoltés pour la production du pain étaient contaminés par des graines d'*Aristolochia Clementitis* riche en AA et localisée à proximité des champs de blé (**Figure 6**) (Hranjec et al, 2005; Stefanovic et al, 2006).

Les plantes contenant les AA furent longtemps utilisées dans de nombreux pays en médecine traditionnelle chinoise pour soigner l'eczéma, l'acné ou encore des douleurs chroniques. Par la suite, les médicaments contenant ces plantes ont été bannis du marché dans beaucoup de pays suite à l'apparition de néphropathies et de tumeurs. Cependant, l'incidence de la NAA est réellement sous-estimée car malgré l'interdiction introduite par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA), de nombreuses personnes à travers le monde sont encore exposées aux AA. En effet, il existe encore d'innombrables produits à base de AA faciles à se procurer sur internet et qui sont légalement utilisés pour des préparations médicales dans de nombreux pays (Vanherweghem, 2002 ; Debelle et al, 2008 ; Gökmen et al, 2013).

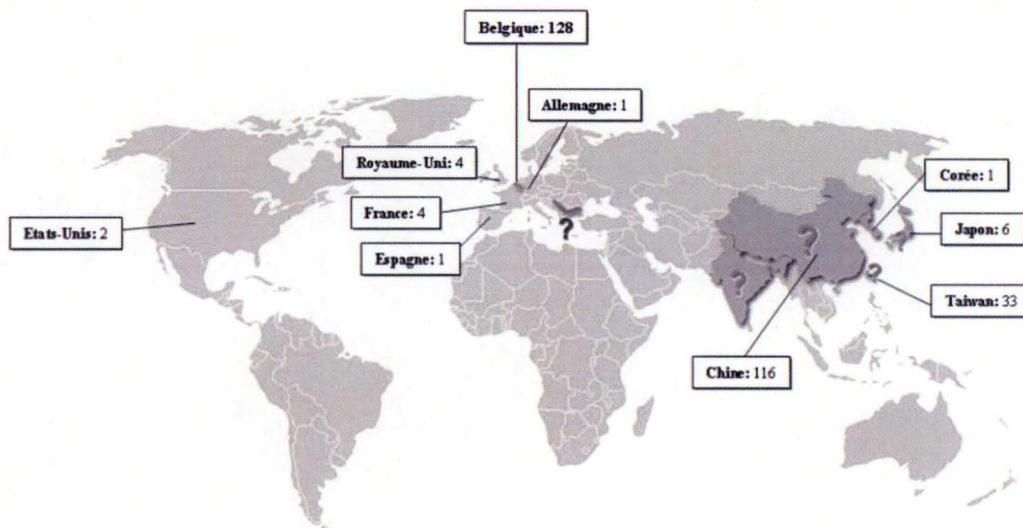


Figure 4 : Nombre de cas connus de NAA répertorié partout dans le monde (Debelle et al, 2009).

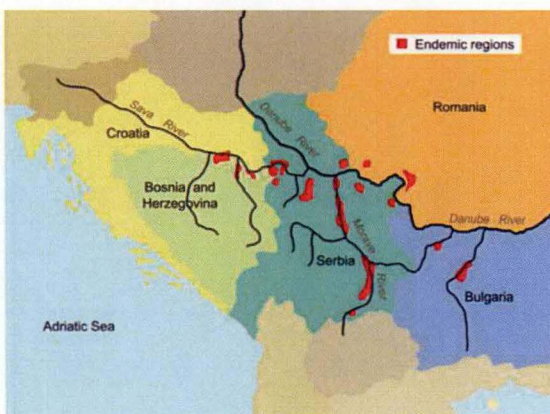


Figure 5 : Carte représentant les différentes régions endémiques (en rouge) qui ont été touchées par la NEB (Grollman, 2013).



Figure 6 : *Aristolochia clementitis* poussant au milieu des champs de blé dans les villages où la NEB s'est manifestée (Slade et al, 2009).

2.2. Cytotoxicité des AA

2.2.1. Carcinogénèse

Les AA sont des acides carboxyliques qui sont produits naturellement par des plantes de type *Aristolochia* (U.S. Department of health and human services, 2011). Parmi les AA, on en distingue deux types majeurs, les AAI et les AAI. Ils sont métaboliquement activés en aristolactames par une réaction enzymatique de nitroréduction. Cette activation réductrice est principalement réalisée au sein des microsomes hépatiques et rénaux, à l'aide de certaines isoformes du cytochrome P450 (CYP1A1 et CYP1A2) et dans une moindre mesure, par la NADPH/CYP réductase. Une fois métabolisés en aristolactames, ceux-ci sont capables de former des adduits avec l'ADN par une simple liaison covalente avec le groupement amine exocyclique des bases puriques. Ces liaisons sont à l'origine de mutations avec pour conséquence la formation de tumeurs (Chen, 2007; Stiborová et al, 2008). En effet, ces liaisons avec l'ADN sont responsables de mutations et augmentent la probabilité d'erreurs qui surviennent lors de la réplication (Slade et al, 2009). Les principaux adduits retrouvés dans les reins des patients souffrant de NAA sont les 7 désoxy-adénosine-N⁶yl aristolactame I (dA-AAI), 7 désoxy-guanosine-N²yl aristolactame I (dG-AAI) et 7 désoxy-adénosine-N⁶yl aristolactame II (dA-AAII) (**Figure 7**) (Nortier et Vanherweghem, 2002). En outre, ces adduits ADN-AA peuvent persister et dès lors être détectés des années après l'intoxication aux AA. Ils peuvent donc servir de biomarqueurs de l'exposition aux AA (Arlt et al, 2004; Jelakovic et al, 2012; Grollman, 2013). Bien que les deux formes de AA soient abondantes chez les plantes qui les produisent, il a été démontré, aussi bien chez l'homme que dans les modèles animaux *in vivo*, que les AAI sont majoritairement responsables de l'effet néphrotoxique conduisant aux lésions tubulaires et au développement d'une fibrose interstitielle. En revanche, les formes AAI et AAI sont toutes deux capables de former des adduits avec l'ADN ayant ainsi un effet carcinogène (Sato et al, 2004; Shibutani et al, 2007).

Les adduits sont donc à l'origine des tumeurs qui se sont manifestées suite à l'ingestion d'AA. L'adduit dA-AAI s'avère être le plus persistant et abondant au sein des tumeurs des tissus cibles (Debelle et al, 2009). Des études réalisées sur les rongeurs ont mis en évidence que l'adduit dA-AAI était responsable d'une mutation de transversion A→T au sein du codon 61 du proto-oncogène H-Ras avec pour conséquence d'activer ce gène (Arlt et al, 2000). En outre, chez les patients NAA, une transversion A→T (AAG→TAG) est également présente au niveau du gène suppresseur de tumeur p53 dans les cellules urothéliales tumorales. La mutation affecte le codon 139 de l'exon 5 dans le gène p53 et mène à l'apparition précoce d'un codon stop (Lys→Stop) (Lord et al, 2004) (**Figure 7**).

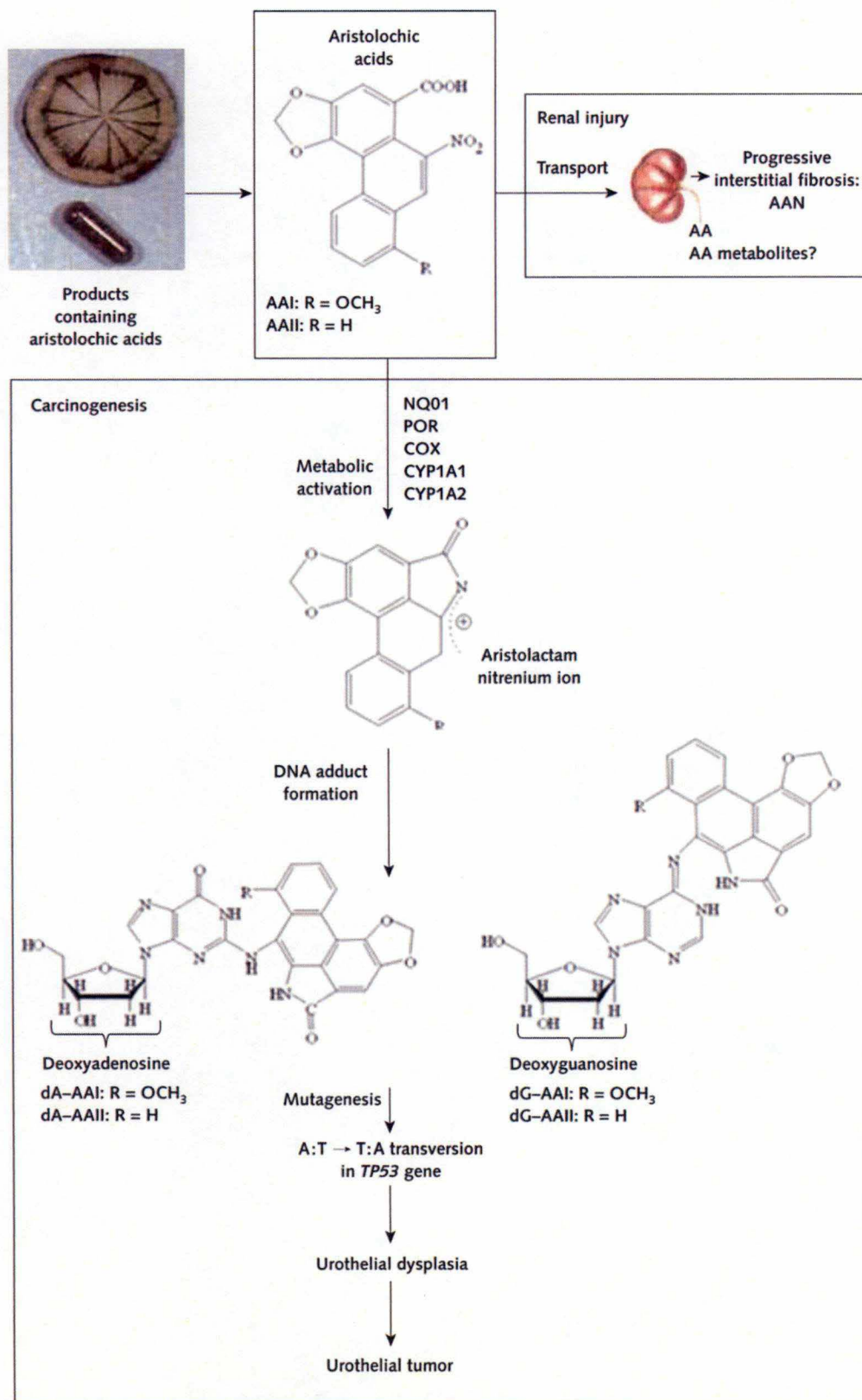


Figure 7 : Métabolisation des AA et formation des adduits d'ADN par les AAI et AAIi à l'origine des tumeurs urothéliales (Gökmen et al, 2013).

2.2.2. Néphrotoxicité

La néphrotoxicité induite par les AA est caractérisée par deux phases consécutives : une phase aiguë et une phase chronique qui ont été établies sur base de l'exploration de divers modèles expérimentaux. La NAA débute ainsi par le développement d'une phase aiguë durant laquelle une nécrose tubulaire se manifeste, touchant principalement les cellules épithéliales des tubules proximaux (PTECs) du segment S3. Au niveau de la lumière de ces tubules, on peut identifier des fragments cellulaires issus de cette nécrose (*Lebeau et al, 2005; Baudoux et al, 2012*). Une infiltration de cellules mononucléaires, principalement des monocytes, des macrophages et des lymphocytes T, envahissant l'espace interstitiel autour des tubules nécrotiques, est également observée (*Pozdzik et al, 2008*).

Par la suite, la néphropathie évolue vers une phase chronique caractérisée par l'apparition d'une fibrose interstitielle sévère résultant de l'activation de fibroblastes résidents en myofibroblastes par l'intermédiaire de cellules inflammatoires, de cytokines et de chimiokines (*Pozdzik et al, 2008*). Un des principaux inducteurs dans cette activation est notamment le TGF- β 1 (transforming growth factor-beta1) (*Leask et Abraham, 2004*). Les fibroblastes ont longtemps été considérés comme la source principale du développement de la fibrose. Cependant d'autres recherches ont pu souligner l'implication des cellules épithéliales tubulaires. En effet, c'est via un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) que les cellules épithéliales se transforment en myofibroblastes. Ce processus se manifeste par une rupture de la membrane basale tubulaire induite par une perte de l'expression de l'E-cadhérine, une molécule d'adhésion intercellulaire tandis que le TGF- β 1 et une protéase dégradant les membranes basales (MMP-2: matrix metalloproteinase-2) sont sécrétés. Cette étape est suivie par la migration des cellules épithéliales vers l'interstitium où elles acquièrent un phénotype mésenchymateux. Les myofibroblastes sont connus pour produire de la matrice extracellulaire en grande quantité contribuant ainsi au développement de la fibrose rénale. Tant que les atteintes rénales persistent, les myofibroblastes demeurent et continuent à produire du collagène qui s'accumule et maintient l'état de fibrose (*Zeisberg et Kalluri, 2004; Lebleu et al, 2013*). Les dommages tubulo-interstitiels prédominent surtout au niveau du cortex superficiel, principalement composé de tubules proximaux, pour ensuite s'étendre au cortex profond (*Depierreux et al, 1994*). En outre, il a été rapporté que le passage à la chronicité s'accompagnait dans certains cas de tumeurs au niveau du tractus urinaire, surtout au niveau de sa partie supérieure. Ces tumeurs peuvent se développer des années après l'apparition de la phase chronique (*Nortier et al, 2002*). Cependant, une dissociation est à faire entre la néphrotoxicité et la carcinogénicité induite par les AA car certaines personnes ayant consommé des AA présentaient un cancer du tractus urinaire sans pour autant que des dommages rénaux aient été détectés (*Nortier et al, 2003*).

La néphrotoxicité s'accompagne d'atteintes fonctionnelles caractérisées par l'augmentation de la quantité de créatinine dans le sérum et par conséquent une diminution de son élimination dans les urines. La créatinine est un produit de dégradation de la créatine dans les muscles et est transportée par le sang puis éliminée par les reins et excrétée dans les urines. Ensemble, les concentrations en créatinine plasmatique et urinaire sont des indicateurs pour évaluer le taux de filtration glomérulaire fournissant ainsi des indications sur l'état général du rein (*Dunn et al, 2004; Lebeau, 2006*). Par ailleurs, les dommages structurels des tubules proximaux sont confirmés par l'excrétion dans les urines de protéines de faible poids moléculaires, telles que la protéine de liaison au rétinol, la protéine des cellules de Clara, l' α_1 -microglobuline et la

β_2 -microglobuline qui devraient normalement être réabsorbées au niveau des tubules proximaux (Kabanda et al, 1995; Lebeau, 2006). Des analyses ont également montré une diminution de l'expression du gène codant pour l'endopeptidase neutre, une peptidase localisée dans la bordure en brosse du segment S3. Par conséquent, on observe une diminution de son excrétion urinaire reflétant ainsi la perte de la bordure en brosse de la portion S3 des tubules proximaux. Un autre signe d'atteintes tubulaires est la libération de l'enzyme lysosomale N-acétyl- β -D-glucosaminidase (NAG) dans les urines (Nortier et al, 1997; Lebeau et al, 2005).

Il a été précédemment montré que les PTECs étaient la cible des AA, suggérant la présence d'un mécanisme moléculaire spécifique permettant l'accumulation des AA au niveau de ces cellules tubulaires. Il existe en effet un système de transport appelé OATs (organic anions transporters) dont certains transfèrent les anions organiques à partir du flux sanguin jusque dans la lumière des tubules. Par ailleurs, ces OATs, majoritairement les OAT 1 et 3, sont exprimés au niveau de la membrane baso-latérale des PTECs et il a été découvert qu'ils jouaient un rôle crucial dans l'accumulation des AA dans les cellules du segment S3 des tubules proximaux. En effet, les AA présentent une grande affinité pour ces OATs. D'ailleurs, l'inhibition de ces transporteurs par le probénécide empêche l'accumulation des AA dans les cellules tubulaires, réduisant ainsi la formation des adduits ADN-AA avec pour conséquence de préserver la viabilité cellulaire. Une diminution des dommages rénaux et une amélioration des fonctions rénales sont également observées suite à cette inhibition (Bakhiya et al, 2009; Dickman et al, 2011; Xue et al, 2011; Baudoux et al, 2012).

En outre, plusieurs facteurs tels que la consommation de tabac, de drogues et certains produits chimiques peuvent agir sur la façon dont un individu réagit face à la toxicité des AA. Un polymorphisme génétique peut également affecter la susceptibilité individuelle à répondre à l'effet toxique des AA en influençant le métabolisme cellulaire ainsi que le transport des AA (Hranjec et al, 2005; Debelle et al, 2008).

2.3. Compartiment vasculaire

Les patients atteints de NAA présentent des glomérules rénaux qui sont relativement épargnés par les AA. Cependant, l'analyse des lésions histologiques sur des biopsies rénales révèlent parfois un collapsus des capillaires glomérulaires accompagnés d'une fragmentation de la membrane basale et d'un épaississement fibreux de la capsule de Bowman (Depierreux, 1994). En outre, une étude réalisée chez le rat a mis en évidence une perte des capillaires péri-tubulaires autour des tubules atrophiques et ce, après 8 semaines de traitement aux AA (Sun et al, 2006). Ce sont des caractéristiques qui apparaissent lors de la phase chronique de la pathologie et joueraient donc un rôle dans la progression vers la fibrose interstitielle. De plus, une étude réalisée en phase aiguë chez le rat, traité pendant 4 ou 7 jours avec des AA, a permis de démontrer que les AA sont responsables d'une ischémie rénale menant à une hypoxie dans le cortex rénal. En effet, Wen et son équipe ont pu mettre en évidence des changements dans l'expression de marqueurs hypoxiques tel que HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 alpha) et une diminution de VEGF (vascular endothelial growth factor) (Wen, 2008). Le VEGF est connu pour être un facteur régulateur de l'angiogenèse en favorisant la survie endothéliale. Pour ce faire, il stimule la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales. Par conséquent, lorsque VEGF est exprimé, il maintient l'intégrité des capillaires péri-tubulaires, ce qui améliore l'hypoxie en approvisionnant les tubules rénaux en oxygène. En outre, VEGF s'avère

être une cible de HIF-1 α qui altère son expression, ayant pour conséquence de réduire le nombre de capillaires péri-tubulaires (Choi et al, 2000; Mayer, 2011). Enfin, Wen et son équipe ont également souligné une perturbation de la balance d'agents vaso-actifs caractérisée par une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) tandis que l'endothéline-1 (ET-1) était surexprimée (Wen, 2008). Ces agents ont pour effet de moduler l'hémodynamique rénale (Lin et al, 1996).

2.4. Modèles expérimentaux de la NAA

A l'heure actuelle, on ne connaît pas les mécanismes d'action précis par lesquels les AA induisent la néphropathie, bien que de nombreuses études aient été menées sur des modèles animaux. En effet, une des premières observations expérimentales sur la toxicité des AA a été réalisée en 1963 par Peters et Hedwall (Peters et Hedwall, 1963). Depuis lors, les atteintes tubulointerstitielles induites par les AA ont été reproduites dans de nombreux modèles *in vivo*, chez la souris, le rat ou le lapin afin d'étudier les caractéristiques des phases aiguë et chronique. Au cours de ces études, les deux composants majeurs des AA (AAI et AAI) ont été utilisés individuellement ou associés et administrés de manière répétée ou non via des méthodes différentes. L'administration de AA effectuée lors de la mise en œuvre de ces modèles *in vivo* a permis de générer des lésions tubulaires ainsi qu'une fibrose interstitielle similaires à ce qui a été observé chez les patients souffrant de NAA. De plus, pour certains animaux, un effet carcinogène a pu être mis en évidence (Menges et al, 1982; Cosyns et al, 2001; Debelle et al, 2002; Sato et al, 2004; Wen Y-J. et al, 2008).

3. Monoxyde d'Azote

3.1. Généralités

Le NO est un important messager moléculaire pouvant agir sur un nombre important de cibles. Cette propriété lui permet d'exercer de nombreuses fonctions dans la neurotransmission ou encore la régulation du tonus vasculaire. Le contrôle de la transcription de gènes et la traduction d'ARNm font également partie des effets qu'il peut exercer (Förstermann et Sessa, 2012). Cependant, la génération de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) via l'activation de la guanylate cyclase soluble (GCs) par le NO reste l'une de ses voies de signalisation principale (**Figure 8**) (Denninger and Marletta, 1999). Par l'intermédiaire de cette voie, le NO peut notamment contribuer au développement angiogénique médié par VEGF (Papapetropoulos et al, 1997; Kang et al, 2002). Le NO joue également un rôle important dans le maintien des fonctions rénales. Par conséquent, un changement dans sa biodisponibilité modifie son implication régulatrice et est à l'origine de nombreuses altérations rénales (Beckman et Koppenol, 1996; Sharma, 2004).

3.2. Synthèse du NO

Le NO est synthétisé grâce à l'activité de trois isoformes de NO synthase (NOS) : la NOS neuronale (nNOS), la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS inductible (iNOS). Ces trois synthases utilisent comme substrat la L-Arginine (L-Arg) accompagnée d'une molécule d'oxygène (O₂) pour produire de la citrulline et du NO. La réaction requiert des co-facteurs tels que le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) qui subit une réduction lors de la réaction en présence de la flavine mononucléotide (FMN) et la tétrahydrobioptérine (BH₄)

(Figure 8). Cette réaction se fait en deux étapes: dans un premier temps, les NOSs hydroxylent la L-Arginine en N^w-hydroxy-L-arginine pour ensuite oxyder cette molécule en L-citrulline et NO (Förstermann et Sessa, 2012).

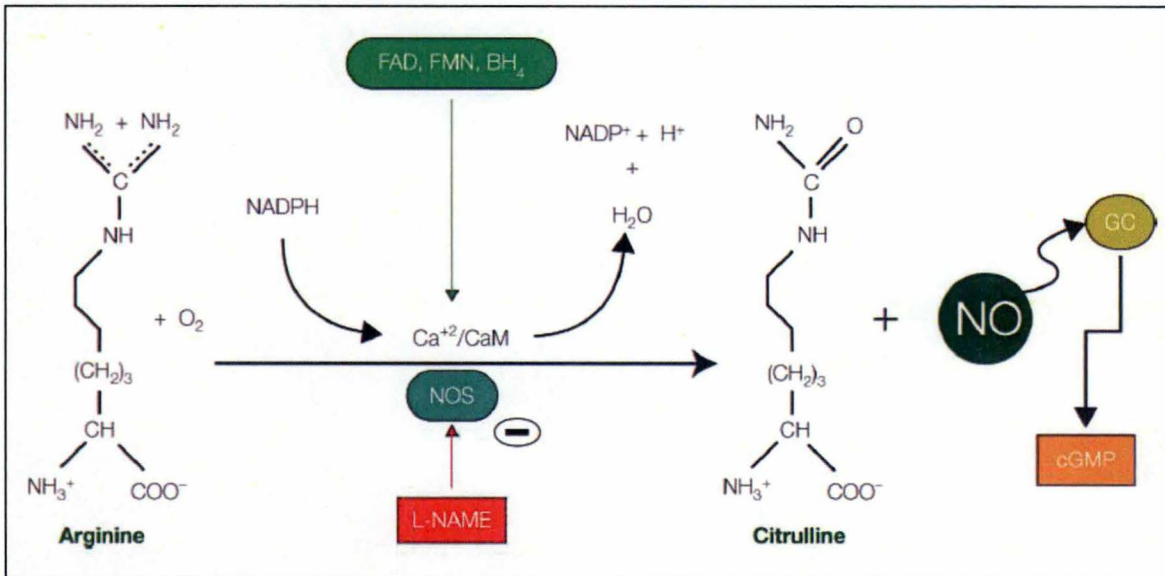


Figure 8 : Représentation de la réaction de synthèse de l'oxyde nitrique et son interaction avec la guanylate cyclase (Freire et al, 2009).

La eNOS est principalement exprimée au niveau des cellules endothéliales. Dès lors, on la retrouve également dans l'endothélium vasculaire rénal comprenant les artérioles et les artères ainsi que les capillaires des glomérules et les vasa recta (Mount et Power, 2006). On peut également la détecter dans les cellules épithéliales tubulaires du rein. Son activité est régulée par le système calmoduline/ Ca^{2+} . En effet, une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire permet d'améliorer l'activité de la calmoduline qui se lie à la synthase et facilite la réduction du NADPH. Le NO produit par la eNOS assure de multiples fonctions dont la régulation de l'homéostasie. Par l'intermédiaire de la voie du GMPc, le NO agit sur les cellules musculaires lisses afin d'induire une dilatation des vaisseaux sanguins (Förstermann et Sessa, 2012). C'est également un inhibiteur de l'agrégation et de l'adhésion plaquettaires ayant pour conséquence de réduire les risques de thrombose. En outre, il est capable de diminuer l'expression de la protéine MCP-1 (Monocyte Chemoattractant protein-1) chargée de recruter les monocytes et les macrophages (Zeiher et al, 1995) et il inhibe l'adhésion des leucocytes à la surface des cellules endothéliales dans le but de limiter le développement de l'athérosclérose (Kubes et al, 1991).

La nNOS est majoritairement exprimée dans les neurones mais elle est présente également au sein du tissu rénal, principalement au niveau de la macula densa mais aussi dans les tubules proximaux et distaux ainsi que dans le canal collecteur (Mount et Power, 2006). De même que pour la eNOS, son activité est dépendante du système calmoduline/ Ca^{2+} . Le NO produit par cette isoforme joue un rôle dans la neurotransmission mais est également impliqué dans la régulation du flux sanguin en diminuant le tonus de cellules musculaires lisses. Par ailleurs, des perturbations dans la production du NO peuvent avoir de sévères conséquences en favorisant l'apparition de maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et Parkinson (Förstermann et Sessa, 2012).

La iNOS, quant à elle, est exprimée dans certaines conditions physiopathologiques. En effet, il n'y a pas d'expression constitutive de la iNOS dans le rein en conditions normales mais elle peut être induite par des stimuli pro-inflammatoires tels que des cytokines et des lipopolysaccharides (LPS) bactériens. N'étant pas régulée par des concentrations de Ca^{2+} intracellulaire pour promouvoir la liaison de la calmoduline, elle reste continuellement active produisant ainsi une concentration élevée en NO (*Förstermann et Sessa, 2012*). Le NO est connu pour avoir un effet anti-inflammatoire (*Zamora et al, 2000*). Cependant, il s'avère être toxique lorsqu'il est produit en grande quantité et est responsable de dommages tissulaires et cellulaires. Cet effet nocif peut être dû au radical NO^\cdot lui-même ou à l'interaction du NO avec l'anion superoxyde qui est produit en cas de stress oxydatif. Dès lors, la réaction entraîne la formation de peroxynitrite (ONOO^-), à l'origine de la peroxydation lipidique, de dommages à l'ADN et de nitro-tyrosination de protéines (*Beckman et Koppenol, 1996; Sharma, 2004*).

3.3. Fonctions du NO dans le rein

Comme mentionné précédemment, les trois isoformes de NOS sont exprimées à divers endroits du rein. Dès lors, en plus de ses multiples applications, le NO s'avère être un important régulateur de la physiologie et pathophysiologie rénales. Au niveau physiologique, le NO a pour fonctions de :

- Moduler l'hémodynamique rénale et glomérulaire en maintenant un flux sanguin rénal normal et une faible résistance vasculaire rénale.
- Réguler le feedback-tubuloglomérulaire, ayant pour but de coupler la réabsorption tubulaire à la régulation de la filtration glomérulaire.
- Réguler le tonus des artérioles afférentes et efférentes via la stimulation des cellules musculaires lisses de la paroi des vaisseaux sanguins.
- Contrôler le transport des fluides et des solutés, comme le Na^+ et le HCO_3^- , en régulant l'hémodynamique rénale ainsi que l'activité nerveuse afférente et efférente, et en agissant directement sur les transporteurs présents sur la membrane des cellules tubulaires.
- Moduler la natriurèse de pression, un mécanisme régulant la pression artérielle en modifiant l'excrétion du Na^+ rénal.
- Réguler la respiration mitochondriale (*Kone, 2004; Sharma, 2004*).

Lorsqu'il y a des perturbations dans la production du NO, celui-ci peut avoir des effets néfastes et avoir une implication dans les maladies rénales (*Klahr, 2001; Sharma, 2004*). On a pu constater précédemment qu'une augmentation du NO était toxique pour les cellules. A l'inverse, une diminution de la production du NO a été mise en évidence dans la NAA (*Wen, 2008*) ainsi que dans d'autres pathologies rénales (*Baylis, 2008*). Les causes d'une diminution de la concentration en NO peuvent être très variables. Il peut s'agir d'une diminution de la synthèse rénale en L-Arg ou alors d'une inactivation de la NOS qui peut se produire lorsque la synthèse d'inhibiteurs endogènes comme le diméthyl-arginine asymétrique (ADMA) est augmentée (*Baylis, 2012*).

La iNOS, quant à elle, est exprimée dans certaines conditions physiopathologiques. En effet, il n'y a pas d'expression constitutive de la iNOS dans le rein en conditions normales mais elle peut être induite par des stimuli pro-inflammatoires tels que des cytokines et des lipopolysaccharides (LPS) bactériens. N'étant pas régulée par des concentrations de Ca^{2+} intracellulaire pour promouvoir la liaison de la calmoduline, elle reste continuellement active produisant ainsi une concentration élevée en NO (*Förstermann et Sessa, 2012*). Le NO est connu pour avoir un effet anti-inflammatoire (*Zamora et al, 2000*). Cependant, il s'avère être toxique lorsqu'il est produit en grande quantité et est responsable de dommages tissulaires et cellulaires. Cet effet nocif peut être dû au radical NO^\cdot lui-même ou à l'interaction du NO avec l'anion superoxyde qui est produit en cas de stress oxydatif. Dès lors, la réaction entraîne la formation de peroxynitrite (ONOO^-), à l'origine de la peroxydation lipidique, de dommages à l'ADN et de nitro-tyrosination de protéines (*Beckman et Koppenol, 1996; Sharma, 2004*).

3.3. Fonctions du NO dans le rein

Comme mentionné précédemment, les trois isoformes de NOS sont exprimées à divers endroits du rein. Dès lors, en plus de ses multiples applications, le NO s'avère être un important régulateur de la physiologie et pathophysiologie rénales. Au niveau physiologique, le NO a pour fonctions de :

- Moduler l'hémodynamique rénale et glomérulaire en maintenant un flux sanguin rénal normal et une faible résistance vasculaire rénale.
- Réguler le feedback-tubuloglomérulaire, ayant pour but de coupler la réabsorption tubulaire à la régulation de la filtration glomérulaire.
- Réguler le tonus des artérioles afférentes et efférentes via la stimulation des cellules musculaires lisses de la paroi des vaisseaux sanguins.
- Contrôler le transport des fluides et des solutés, comme le Na^+ et le HCO_3^- , en régulant l'hémodynamique rénale ainsi que l'activité nerveuse afférente et efférente, et en agissant directement sur les transporteurs présents sur la membrane des cellules tubulaires.
- Moduler la natriurèse de pression, un mécanisme régulant la pression artérielle en modifiant l'excrétion du Na^+ rénal.
- Réguler la respiration mitochondriale (*Kone, 2004; Sharma, 2004*).

Lorsqu'il y a des perturbations dans la production du NO, celui-ci peut avoir des effets néfastes et avoir une implication dans les maladies rénales (*Klahr, 2001; Sharma, 2004*). On a pu constater précédemment qu'une augmentation du NO était toxique pour les cellules. A l'inverse, une diminution de la production du NO a été mise en évidence dans la NAA (*Wen, 2008*) ainsi que dans d'autres pathologies rénales (*Baylis, 2008*). Les causes d'une diminution de la concentration en NO peuvent être très variables. Il peut s'agir d'une diminution de la synthèse rénale en L-Arg ou alors d'une inactivation de la NOS qui peut se produire lorsque la synthèse d'inhibiteurs endogènes comme le diméthyl-arginine asymétrique (ADMA) est augmentée (*Baylis, 2012*).

3.4. Pharmacothérapie

La L-Arg endogène est utilisée comme substrat pour produire du NO. Dès lors, des questions se sont posées sur son potentiel effet thérapeutique en cas de diminution de la biodisponibilité du NO. De nombreuses études ont pu mettre en évidence une augmentation de la production en NO via une supplémentation en L-Arg dans certaines maladies rénales, ayant pour effet d'améliorer la pathologie (*Klahr et Morrissey, 2004; Kurus et al, 2005*). Dans le cas contraire, où le NO se révèle être délétère pour le bon fonctionnement du rein, une inhibition de l'activité des NOSs par le N^G-nitro-L-arginine méthyle ester (L-NAME) semble être bénéfique (*Saracyn et al, 2014*).

4. Objectifs du travail

L'objectif de ce travail est d'étudier, dans un modèle de souris NAA, la transition entre la phase aiguë et la phase chronique. Jusqu'à présent, peu d'études renseignent sur les mécanismes impliqués dans la NAA. Cependant, plusieurs recherches mettent en évidence une diminution de la biodisponibilité en NO dans la NAA. En outre, nous avons précédemment montré dans notre laboratoire qu'augmenter la biodisponibilité en NO via l'administration de L-Arg à des souris atteintes de NAA aiguë, permettait d'améliorer les fonctions rénales et atténuer les dommages tubulaires (*Declèves et al, 2015*). Ces observations ont également été rapportées par d'autres chercheurs étudiant l'insuffisance rénale. Dès lors, nous avons décidé d'en observer les effets à long terme dans un modèle chronique afin d'examiner si la L-Arg pouvait également avoir un impact positif sur la chronicité de cette pathologie.

Le but de notre travail est donc d'évaluer l'impact d'une supplémentation en L-Arg sur le modèle de souris NAA chronique. Durant cette expérimentation, nous avons analysé les effets du traitement en effectuant un suivi longitudinal, afin de déterminer l'influence de la L-Arg durant la transition de l'état aigu à la phase chronique. Pour ce faire, nous avons injecté 3,5 mg/kg de AA à des souris C57BL/6 par voie intrapéritonéale (une injection par jour pendant 4 jours) et un apport en L-Arg a été administré en simultané (une semaine avant la première injection de AA et durant tout le protocole).

Matériel et Méthodes

1. Protocole expérimental

1.1. Animaux

Le protocole a été réalisé sur 72 souris mâles C57BL/6 âgées de 6 à 7 semaines (Janvier, France). L'étude a été approuvée par le comité d'éthique du bien-être et de la santé des animaux de laboratoire de l'Université de Namur (CEEXPANI). Au cours de l'expérimentation, les souris ont été hébergées dans un environnement où la température et l'humidité étaient contrôlées chaque jour, avec un éclairage suivant un cycle jour/nuit de 12h/12h. Les animaux avaient également un libre accès à de l'eau et de la nourriture standard adaptée aux rongeurs (SAFE A03, France).

1.2. Traitements

Différents traitements ont été administrés aux souris selon leur groupe expérimental (**Tableau 1**) et ont été préparés de la manière suivante :

- Solution contrôle : cette solution a été préparée en diluant du tampon phosphate salin (PBS 10%, pH 7,4) dans du NaCl stérile 0,9% et a ensuite été administrée par injection intrapéritonéale (10 ml/kg de poids corporel).
- Solution AA : une solution-mère a été préparée en diluant 1 mg/ml de AAI (Sigma-Aldrich, USA) dans du PBS. La solution a ensuite été chauffée au bain-marie à 60°C pendant 40 minutes et fréquemment vortexée. La solution-mère a finalement été stockée à température ambiante, à l'abri de la lumière. Par la suite, la solution a été diluée dans du NaCl stérile 0,9% pour être injectée par voie intrapéritonéale (10 ml/kg de poids corporel).
- Traitement L-Arg : cette solution a été préparée en diluant de la L-Arginine (Sigma-Aldrich, USA) dans l'eau de ville (5%). Sur la base d'un comportement dipsique normal, la quantité de L-Arg ingérée quotidiennement par un animal pesant 25 g équivaut à environ 0,19 g/24h.

Tableau 1 : Traitements reçus dans les différents groupes expérimentaux.

	Contrôle (n=18)	AAI (n=18)	L-Arg (n=18)	AAI + L-Arg (n=18)
Nombre de souris	J5: n=6 J10: n=6 J20: n=6	J5: n=6 J10: n=6 J20: n=6	J5: n=6 J10: n=6 J20: n=6	J5: n=6 J10: n=6 J20: n=6
Solution injectée par voie i.p.	PBS dilué 1:2,8 dans du NaCl stérile 0,9%	Solution mère de AA diluée 1:2,8 dans du NaCl stérile 0,9%	PBS dilué 1:2,8 dans du NaCl stérile 0,9%	Solution mère de AA diluée 1:2,8 dans du NaCl stérile 0,9%
Dose injectée	3,5 mg/kg	3,5 mg/kg	3,5 mg/kg	3,5 mg/kg
Traitement oral	Eau de ville	Eau de ville	Eau de ville avec 5% de L-Arg	Eau de ville avec 5% de L-Arg

I.p. : voie intrapéritonéale

1.3. *Protocole expérimental*

Les souris ont été réparties de manière aléatoire dans 4 groupes expérimentaux selon le traitement qui leur a été administré. Après une semaine d'acclimatation à leur nouvel environnement, le traitement à la L-Arg a été ajouté à l'eau de boisson et ce, une semaine avant le début des injections de AA (J-7), le traitement a été poursuivi jusqu'au jour du sacrifice. Les injections intrapéritonéales de AA ont été réalisées une fois par jour et ce, pendant 4 jours consécutifs (J 1 à J 4) (**Figure 9**).

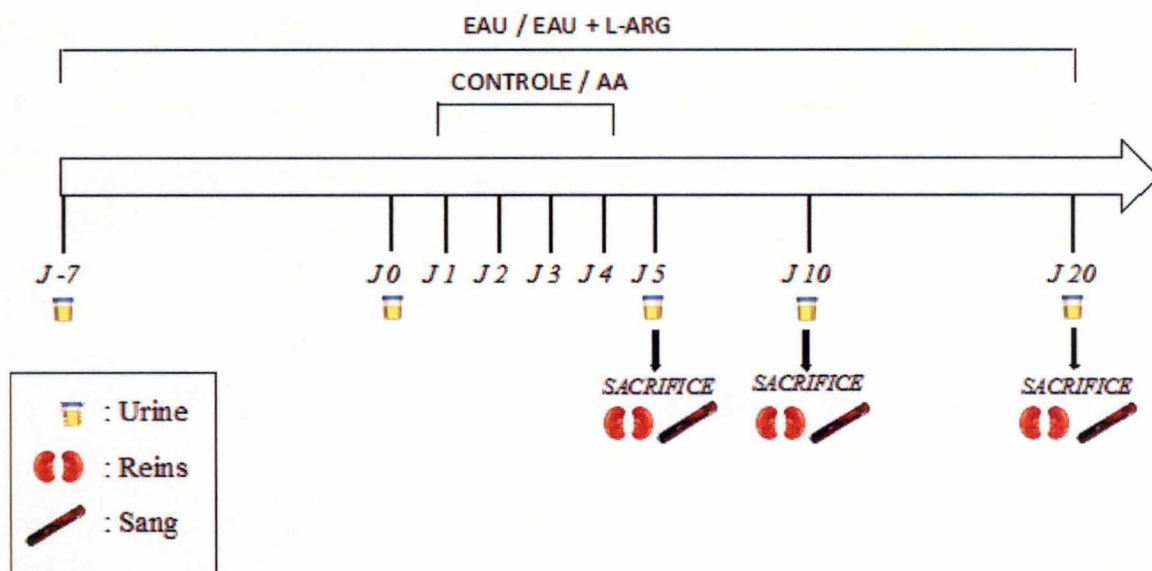


Figure 9 : Schéma illustrant le protocole expérimental.

A différents moments clés au cours du protocole expérimental, les animaux ont été placés en cages métaboliques, permettant ainsi de récolter des échantillons d'urine mais aussi de mesurer les quantités d'eau et de nourriture consommées. L'urine récoltée a ensuite été aliquotée et conservée à -80°C pour des analyses ultérieures. A la fin du protocole, les souris ont été anesthésiées grâce à une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (80 mg/kg, SEVA, Belgique) et de médétomidine (0,5 mg/kg, Elanco, Belgique). Une laparotomie a ensuite été réalisée dans le but de collecter le sang par ponction intracardiaque. L'échantillon de sang a été traité avec de l'héparine (100 UI/ml, Léo Pharma, Belgique) afin de récupérer la fraction plasmatique après centrifugation à 2500 rpm pendant 10 minutes à 4°C . Par la suite, les deux reins et le foie ont été extraits et pesés. Une partie du rein et du foie a été fixée dans une solution de Bouin-alcool (voir 2.11.) afin de réaliser ultérieurement des analyses histologiques et immunohistochimiques. Le tissu restant a été fractionné et réparti dans plusieurs tubes pour ensuite être congelé dans de l'azote liquide et conservé à -80°C . Ces manipulations ont été réalisées dans des conditions « RNase free ».

2. Analyse des échantillons biologiques

2.1. Mesure de l'osmolarité urinaire

Dans le but de mesurer le nombre d'osmoles de soluté par litre d'eau, les échantillons urinaires ont préalablement été dilués 10 fois et l'osmolarité a été mesurée à l'aide d'un micro-osmomètre (Fiske®210 Micro-Osmometer, USA). Cet appareil détermine l'osmolarité (mOsm/l) en mesurant le point de congélation du liquide. L'échantillon a été, par conséquent, refroidi et sa cristallisation a été induite par une impulsion mécanique. La solution a ensuite été réchauffée jusqu'à ce qu'un équilibre entre l'eau et la glace ait été atteint. Plus l'osmolarité de l'échantillon est élevée, plus la température pour atteindre le point de congélation est basse.

2.2. Quantification de la protéinurie

Dans le but d'évaluer des altérations rénales, la concentration en protéines urinaires a été quantifiée selon la méthode colorimétrique de Bradford (Bradford Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA). Au cours de cette manipulation, une solution standard d'albumine (Sigma-Aldrich, USA) ainsi que du bleu de Coomassie (réactif de détection capable de se lier aux protéines) (Coomassie Brilliant Blue 20%, Sigma-Aldrich, USA - MetOH:H₂O 72% - Acide acétique glacial 8%, Sigma-Aldrich, USA) ont été utilisés. Le bleu de Coomassie a directement été ajouté aux échantillons urinaires dilués 20 fois ainsi qu'aux échantillons d'albumine de concentration connue. Dans ce test, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en protéines présentes dans l'échantillon. Ensuite, l'absorbance de chaque échantillon a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Versa max micro plate reader, Molecular Devices, USA) à une longueur d'onde de 640 nm. Une courbe standard a ensuite été réalisée grâce aux échantillons de concentration connue et à leur absorbance relative. L'équation obtenue a permis de calculer la concentration en protéines des échantillons urinaires qui sera exprimée en mg/mg Créatinine (Cre).

2.3. Concentrations plasmatique et urinaire en créatinine

Les concentrations plasmatique et urinaire en créatinine ont été mesurées afin d'évaluer des altérations au niveau de la filtration glomérulaire. En outre, la concentration urinaire en créatinine a permis de normaliser les valeurs des concentrations d'autres molécules excrétées. La concentration en créatinine plasmatique a été mesurée dans l'Unité de Néphrologie expérimentale (ULB-Erasme) grâce à une technique de chromatographie en phase liquide à haute performance (Binary HPLC pump-water, USA). Cette technique permet de séparer les différents solutés présents dans le plasma en fonction de leurs caractéristiques d'hydrophobicité/hydrophilie, leur masse moléculaire, leur structure tridimensionnelle ou encore de leur charge. Ces solutés traversent ensuite un détecteur à UV permettant de doser les molécules d'intérêt. La concentration plasmatique en créatinine est exprimée en $\mu\text{mol/l}$. En ce qui concerne la créatinine urinaire, sa concentration a été mesurée grâce à un kit de détection colorimétrique (Enzo Life Sciences, USA). Un réactif de détection de la créatinine a été ajouté aux puits contenant les échantillons préalablement dilués 10 fois. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, l'absorbance a été mesurée grâce à un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 490 nm. La concentration urinaire en créatinine a été déterminée sur base d'une courbe standard et est exprimée en mg/dl.

2.4. Concentration plasmatique en urée

Afin d'évaluer des altérations de la filtration glomérulaire, la concentration plasmatique en urée a été mesurée à l'aide d'un dosage colorimétrique (Quantichrom™ Urea assay kit, Bioassay Systems, USA). Pour ce faire, les échantillons plasmatiques dilués 20 fois ont été placés dans des puits et un réactif chromogénique y a ensuite été ajouté. Ce réactif forme un complexe coloré avec l'urée, l'intensité de la coloration étant proportionnelle à la concentration en urée dans les échantillons. Ensuite, après une incubation de 20 minutes, l'absorbance a été mesurée avec un spectrophotomètre à 520 nm. La concentration plasmatique en urée a été déterminée sur base d'une courbe standard et exprimée en mmol/l.

2.5. Concentration urinaire en nitrates/nitrites

Afin de déterminer de manière indirecte la biodisponibilité intra-rénale en NO, les échantillons urinaires ont été préalablement dilués 150 fois et la concentration en nitrates/nitrites (NOx) a été mesurée grâce à un kit basé sur la réaction de Griess (nitrate/nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical Company, USA). Le test a été réalisé en deux étapes : en premier lieu, un co-facteur de la nitrate réductase, ainsi que l'enzyme nitrate réductase ont été utilisés pour convertir le nitrate en nitrite, pendant une incubation d'une heure à température ambiante. Au cours de la deuxième étape, le réactif de Griess a été ajouté dans les puits afin de convertir le nitrite en un composé azoïque qui est de couleur pourpre foncé pendant 10 minutes à température ambiante. L'absorbance a ensuite été lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm. La concentration urinaire en nitrates/nitrites a été déterminée sur base d'une courbe standard et exprimée en $\mu\text{mol/mg Cre}$.

2.6. Concentration urinaire en GMPc

Afin de déterminer de manière indirecte la biodisponibilité en NO, la concentration urinaire en GMPc, un second messenger impliqué dans une des voies de signalisation activées par le NO, a été évaluée grâce à un kit Elisa (cGMP EIA Kit, Cayman Chemical Company, USA) sur des échantillons urinaires préalablement dilués 1000 fois. Ce test est basé sur la compétition entre le GMPc libre et le GMPc lié à l'acétylcholinestérase (GMPc-AChE) qui sert de traceur (traceur GMPc). Les puits ont été préalablement coatés avec des anticorps (mouse monoclonal anti-rabbit IgG) capables de lier des anticorps de lapin anti-GMPc. Les échantillons urinaires et les échantillons standards de concentration connue en GMPc ont ensuite été ajoutés dans les puits, ainsi que le traceur et l'anti-sérum de lapin spécifique au GMPc. Il est à noter que la quantité de traceur est constante par rapport au GMPc libre trouvé dans les échantillons. Ensuite, la plaque a été incubée pendant 18 heures à température ambiante. Après ce délai, les puits ont été lavés afin d'éliminer les anticorps de lapin et le GMPc-AChE qui ne se seraient pas attachés au fond du puits. Par la suite, le réactif d'Ellmans contenant le substrat de l'AChE a été rajouté, induisant ainsi une réaction enzymatique qui s'est manifestée par une coloration jaune se développant au cours d'une incubation de 60 minutes dans l'obscurité. Enfin, l'absorbance a été lue avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 420 nm. L'intensité de la coloration dépend de la quantité de GMPc-AChE liée aux anticorps anti-GMPc. En effet, si cette dernière est grande, cela signifie qu'il y a une grande proportion de GMPc-AChE qui se sont liées aux anticorps et qu'il y a peu de GMPc libre présent dans l'échantillon. A l'inverse, s'il y a beaucoup de GMPc libre, il y aura moins de GMPc-AChE qui se lieront aux anticorps.

Dès lors, l'intensité de la coloration sera moins importante. La concentration en GMPc urinaire a été déterminée sur base d'une courbe standard et exprimée en $\mu\text{mol/mg Cre}$.

2.7. Analyses histologiques et immunohistochimiques

2.7.1. **Prétraitement**

Les analyses histologiques et immunohistochimiques permettant respectivement d'étudier la morphologie rénale et de mettre en évidence un antigène particulier dans le rein, ont été réalisées sur des tissus préalablement fixés dans une solution de Bouin-alcool (acide picrique 1%, Sigma-Aldrich, USA - formol 40%, Univar, Belgique - éthanol 95%, Univar, Belgique - acide acétique, VWR, Belgique - eau distillée) pendant 48 heures. Par la suite, afin de les déshydrater, les échantillons tissulaires ont été immergés successivement dans 3 bains d'éthanol pendant 24 heures et dans 3 bains de butanol pendant les 24 heures suivantes. Les échantillons ont ensuite été placés dans 3 bains successifs de paraffine ayant chacun une durée de 24 heures. Après cela, les tissus ont été inclus dans la paraffine. Des sections de 5 micromètres d'épaisseur ont pu être ainsi coupées à partir des blocs de paraffine à l'aide d'un microtome (Leica RM2155, Germany). Avant de pouvoir réaliser des analyses histologiques et immunohistochimiques, les coupes de tissus ont été déparaffinées en les plongeant successivement dans 2 bains de toluène et 3 bains d'éthanol de 3 minutes chacun et puis dans de l'eau de ville pendant 15 minutes afin de réhydrater les tissus.

2.7.2. **Colorations**

- *PAS (Periodic Acid Schiff) :*

Les sections de tissus ont été colorées au PAS (Pararosaniline 1% et métabisulfite de sodium 4%, Sigma, USA) afin de mettre en évidence les glucides, les protéines et les glycoprotéines. Cette coloration débute par un traitement des lames déparaffinées avec de l'acide périodique 1% pendant 8 minutes (VWR, Belgique), suivi d'un bain dans le PAS pendant 2 minutes. Les lames sont ensuite rincées pendant 10 minutes à l'eau courante avant d'être placées dans de l'hémalum (Hématoxyline (Mayer), J.T. Baker, Hollande) pendant 3 minutes, ce traitement permet de colorer les noyaux en brun. Ensuite, après un rinçage de 5 minutes à l'eau courante, les lames sont plongées dans du bleu de Luxol (0,1% d'éthanol 95%, Luxol fast blue, Alfa Aesar®, Germany) pendant 2 minutes. Cette coloration permet de mettre en évidence le cytoplasme des cellules en bleu. Après ces étapes de coloration, les tissus sont à nouveau déshydratés en les plongeant successivement dans 3 bains d'éthanol, 1 bain de butanol et 2 bains de toluène. Les coupes de reins peuvent ensuite être montées entre les lames et les lamelles couvre-objet et observées au microscope optique au grossissement 400x afin de déterminer l'étendue des dommages tubulaires (voir point 3 pour la méthode de comptage).

- *Rouge picrosirius :*

Les sections de reins ont été colorées au rouge picrosirius (acide picrique, VWR, Belgique - rouge sirius, Réactifs RAL, France) pour mettre en évidence les fibres de collagène en rouge. Les lames ont tout d'abord été immergées dans de l'acide phosphomolybdique pendant 5 minutes (0,2%, Merck, Belgique) et puis dans le rouge picrosirius pendant 90 minutes. Par la suite, les lames ont été plongées dans de l'éthanol 70% mélangé avec de l'HCl (0,01 M, VWR, Belgique) pendant 2 minutes suivi d'un bain dans d'éthanol 70% pendant 1 minute. Enfin, les tissus ont à nouveau été déshydratés en les plongeant successivement dans 3

MATÉRIEL ET MÉTHODES

bains d'éthanol, 1 bain de butanol et 2 bains de toluène. Les coupes de reins peuvent ensuite être montées entre les lames et les lamelles couvre-objet et analysées au microscope optique au grossissement 400x.

2.7.3. Immunohistochimie

L'immunomarquage est une technique permettant de mettre en évidence un antigène spécifique dans une structure biologique. Les tissus doivent tout d'abord être traités avec un tampon citrate (0,01M à pH 6,2, Sigma-Aldrich, USA) afin de démasquer les antigènes qui seront ciblés par les anticorps. Ensuite, l'activité des peroxydases endogènes a été inhibée en utilisant du peroxyde d'hydrogène (Merck KGaA, Allemagne). Par la suite, 30 µl d'avidine (Vector Laboratories Inc., USA), préalablement diluée 100 fois, ont été déposés sur les tissus pendant 15 minutes dans le but de se lier à la biotine endogène présente dans le tissu. Après cette étape, 30 µl de biotine (Vector Laboratories Inc., USA), préalablement diluée 100 fois, ont également été déposés pendant 15 minutes. Les tissus ont ensuite été incubés avec de la caséine (Sigma, USA) pendant 1 heure afin d'éviter le bruit de fond en saturant les sites aspécifiques. Cette étape a été suivie par l'incubation des tissus avec l'anticorps primaire qui varie selon l'antigène visé (**Tableau 2**). Les coupes ont ensuite été incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé approprié (**Tableau 2**). Par la suite, les coupes ont été traitées avec de la streptavidine-HRP (Dako, Danemark) pendant 30 minutes. En effet, ce produit contient de la streptavidine qui va se lier avec la biotine présente sur l'anticorps secondaire afin d'amplifier le signal. Enfin, l'activité peroxydase a ensuite été visualisée à l'aide d'une solution DAB (3'-diaminobenzidine, Vector Laboratories, USA) qui contient 0,02% d'H₂O₂ capable de réagir avec les peroxydases pour induire l'oxydation du DAB, qui précipite alors sous forme d'un composé brun. Au terme de ces étapes, une contre-coloration a été effectuée grâce à de l'hémalum et du bleu de luxol, suivie d'une déshydratation. Les coupes peuvent ensuite être montées entre les lames et les lamelles couvre-objet et analysées au microscope optique au grossissement 400x.

Tableau 2 : Liste des différents marquages immunohistochimiques réalisés et des anticorps primaires et secondaires correspondants

Antigène	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
α -SMA (IHC)	Lapin, 1:50 1h (Abcam, Royaume-Unis)	Boost, HRP anti-lapin 30min (Cell Signaling Technology, USA)
PCNA (IHC)	Lapin, 1:40 ON (Abcam, Royaume-Unis)	Boost, HRP anti-lapin 30 min (Cell Signaling Technology, USA)
Macrophages (IHC)	Rat, 1:50 ON (Abcam, Royaume-Unis)	Mouton anti-rat biotinylé, 1:50 1h (AdD Serotec, Royaume-Unis)

α -SMA: *alpha-Smooth Muscle Actin*; PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*; ON: *Over Night*; IHC: *immunohistochimie*.

2.8. *PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)*

2.8.1. Extraction d'ARN

Les échantillons de rein préalablement prélevés de manière « RNAase free » ont été homogénéisés en utilisant des potters électriques dans lesquels 1 ml de Trizol (TRI reagent, Sigma-Aldrich, USA) a été ajouté afin d'extraire l'ARN. Les homogénats, en présence de Trizol, ont été mis en incubation pendant 5 minutes à température ambiante avant d'y ajouter 200 µl de chloroforme (VWR, France). Après centrifugation des échantillons à 4100 rpm pendant 20 minutes à 4°C, la phase aqueuse contenant l'ARN a été prélevée et déposée dans un nouvel eppendorf autoclavé. Ensuite, 500 µl d'isopropanol (Merck, Allemagne) ont été ajoutés à la phase aqueuse afin que l'ARN précipite. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, les échantillons mélangés à l'isopropanol ont à nouveau été centrifugés à 4100 rpm pendant 15 minutes à 4°C. A la suite de cette étape, l'ARN a précipité dans le culot. Dès lors, après avoir enlevé le surnageant, le culot a été lavé avec 1ml d'éthanol 75% puis à nouveau centrifugé à 4100 rpm pendant 5 minutes à 4°C afin d'éliminer les impuretés. Pour finir, le surnageant a été soustrait et le culot contenant l'ARN a été conservé à -80°C jusqu'au traitement à l'ADNase.

2.8.2. Traitement à l'ADNase

Après l'extraction, l'ARN a été incubé avec un mix de solution contenant 1 µl d'ADNase, 1 µl de tampon ADNase et 8 µl d'eau RNAse free (Promega, Belgique) pendant 30 minutes à 37°C. Cette étape permet de dégrader l'ADN présent dans les échantillons. Ensuite, la réaction a été stoppée par l'ajout d'ADNase STOP (Promega, Belgique) et deux incubations successives ont été réalisées en présence du produit STOP : la première pendant 30 minutes à 37°C et la deuxième pendant 10 minutes à 65°C. Après ces étapes, les échantillons ont été dilués dans 9 µl d'eau RNAse free afin de déterminer la concentration en ARN au Nanodrop (NanoDrop 1000 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA).

2.8.3. Reverse transcriptase (RT-PCR)

Une RT-PCR a été réalisée dans le but de transformer l'ARN en ADN complémentaire (ADNc). Pour ce faire, le volume d'ARN à prélever a été calculé en fonction de la concentration en ARN de l'échantillon mesurée par le Nanodrop afin d'en obtenir 2 µg. Pour ce faire, l'ARN a été dilué dans de l'eau RNAse free et chauffé à 65°C pendant 8 minutes, puis un mix RT a été ajouté à cette solution. Ce mix contient : 7 µl d'eau RNAse free, 1 µl de dNTP (Promega, Belgique), 1 µl de M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus RT, ADN polymérase dépendant de l'ARN) (Promega, Belgique), 4 µl de tampon M-MLV RT (Promega, Belgique) et 1 µl de random hexamer 1/10 (Roche, Applied Biosystems, USA). Ces mélanges ont ensuite été vortexés et centrifugés avant d'être incubés pendant 10 minutes à 25°C, 50 minutes à 42°C et enfin pendant 15 minutes à 70°C (BioRad, T100™ Thermo Cycle, Belgique). Après cela, les échantillons ont été dilués et conservés à -80°C.

2.8.4. qRT-PCR

Pour terminer, une qRT-PCR a été réalisée afin de mesurer l'expression relative des différents gènes d'intérêt. Tout d'abord, un mix contenant les primers sens et anti-sens ainsi que du FastStart Essential DNA Green Master (molécule fluorescente capable de se lier à l'ADN amplifié afin de permettre sa détection) (Roche, USA) a été préparé. Un gène contrôle,

appelé « *housekeeping gene* », qui est ici le gène d'ARN ribosomal 18S a été sélectionné pour servir de valeur de référence. Une fois préparé, le mix a été déposé sur une plaque (LightCycler 96 480 multiplate 96 white, Roche, USA) et 5 µl d'ADNc y ont été ajoutés. La plaque a été centrifugée pendant 3 minutes à 1200 rpm pour ensuite être insérée dans la machine à PCR quantitative (LightCycler 96, Roche, USA). Après un certain nombre de cycles, des valeurs ont été obtenues et sur base de plusieurs calculs, ont permis d'évaluer l'expression relative d'ARNm présent dans les échantillons rénaux. Pour ce faire, les résultats obtenus sont tout d'abord normalisés grâce au « *housekeeping gene* », puis ceux-ci sont relativisés par rapport à un point contrôle et pour finir, les données sont rendues biologiquement interprétables en faisant une exponentielle.

3. Analyses statistiques

Les données présentées correspondent à des valeurs moyennes \pm S.E.M (Standard Error of the Mean). L'évaluation de la signification statistique entre les groupes a été effectuée par une analyse des variances (two way ANOVA) suivie par un test post-hoc (Holm-Sidak post-test) pour les comparaisons multiples entre les groupes (SigmaStat, Jandel Scientific, Germany). Le seuil de signification a été défini tel que $p < 0,05$.

- Le calcul de la variation du poids corporel a été effectué grâce à la formule suivante : $((\text{Poids au Jx (g)} - \text{Poids au J0 (g)}) / \text{Poids au J0 (g)}) * 100$.
- Le calcul du pourcentage de dommages tubulaires a été effectué grâce à la formule suivante : $(\text{Nombre de tubules lésés} / \text{Nombre total de tubules}) * 100$ et été évalué en double aveugle sur 10 champs par animal au grossissement 400x. Les dommages tubulaires sont basés sur la présence de cellules nécrotiques, de casts dans la lumière des tubules et d'altérations de la bordure en brosse.
- Le nombre de macrophages a été évalué en comptant le nombre de cellules positives pour le marquage par champ. Cette analyse a été réalisée en double aveugle et sur 10 champs par animal au grossissement 400x.
- Le calcul du pourcentage du marquage de PCNA a été effectué grâce à la formule suivante : $(\text{Nombre de noyaux positifs à PCNA} / \text{Nombre total de noyau}) * 100$ et évalué en double aveugle sur 10 champs par animal au grossissement 400x. Le nombre de noyaux positifs pour PCNA a été évalué d'une part dans les cellules tubulaires et d'autre part, dans les cellules interstitielles.
- Les quantifications de marquage pour α SMA et du rouge picrosirius ont été réalisées par analyse morphométrique grâce au programme informatique « *ImageJ Macbiophotonics* ». La proportion de coloration a été quantifiée dans le rein sur 10 champs par animal au grossissement 400x.

Résultats

Il a précédemment été prouvé dans notre laboratoire qu'un traitement à la L-Arg pouvait avoir un effet bénéfique sur la phase aigüe de la NAA dans un modèle murin. Dès lors, l'objectif de ce mémoire est d'évaluer l'impact d'un traitement à la L-Arg sur le développement de la NAA, de la phase aigüe jusqu'à phase chronique de la pathologie.

1. Partie 1 : Etude des effets de la L-Arginine en conditions contrôles

La première partie de notre étude a pour but de mettre en évidence les effets de l'administration de L-Arg en conditions contrôles. Pour ce faire, nous avons comparé les groupes de souris contrôles (CTL) et de souris recevant uniquement un traitement à la L-Arg (CTL+L-Arg) dans l'eau de boisson (5%). Nous avons comparé les données obtenues à partir des analyses réalisées sur des échantillons récoltés tout au long du protocole expérimental, c'est-à-dire aux J5, J10 et J20.

1.1. *Mesure de la biodisponibilité en NO*

La biodisponibilité en NO a été évaluée grâce à des mesures indirectes, à savoir, les mesures des excréctions urinaires des NOx et du GMPc (**Figure 10**). Comme mentionné précédemment, la L-Arg étant un précurseur pour la synthèse du NO, ces mesures nous ont permis de déterminer l'impact du traitement à la L-Arg en condition contrôlée. On constate qu'aux J5 et J20, l'excrétion urinaire des NOx est significativement augmentée chez les souris CTL+L-Arg par rapport à celle mesurée chez les souris CTL. En revanche, au J10, les valeurs obtenues sont similaires dans les deux groupes (**Figure 10A**). En ce qui concerne, l'excrétion urinaire du GMPc, celle-ci est augmentée aux J5 et J10 dans le groupe de souris CTL+L-Arg par rapport aux souris CTL, alors qu'au J20, l'excrétion s'avère similaire entre les deux groupes (**Figure 10B**).

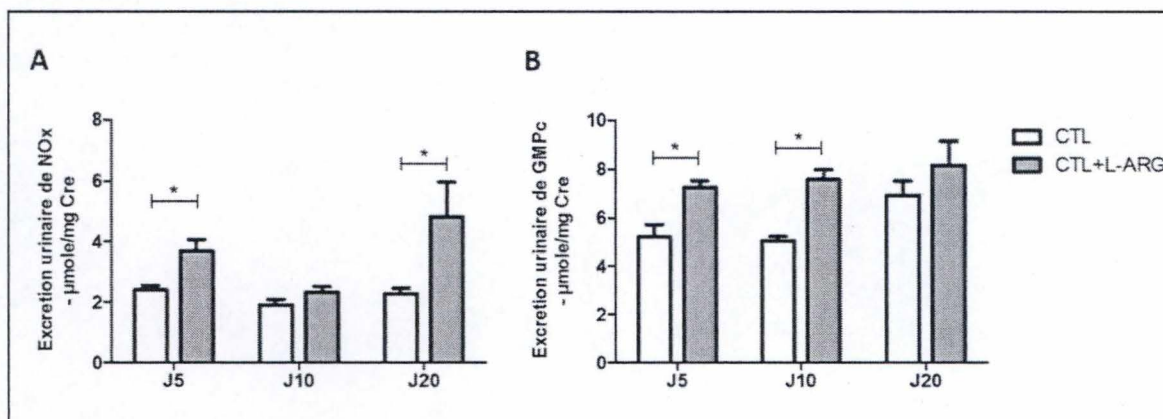


Figure 20 : Analyse de l'excrétion urinaire de NOx ($\mu\text{mole/mg}$ Créatinine) (A) et de GMPc ($\mu\text{mole/mg}$ Créatinine) (B) des souris CTL et CTL+L-Arg, 5, 10 et 20 jours après la première injection de AA. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM. N=6 pour chaque groupe. Analyses statistiques : Two Way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Holm-Sidak : * $p < 0,05$ vs CTL.

1.2. *Données métaboliques*

Les données métaboliques obtenues dans les deux groupes sont détaillées dans le **Tableau 3**. Tout d'abord, une augmentation similaire du poids corporel est observée dans les deux groupes, excepté au J10 où les souris CTL+L-Arg présentent une évolution du poids corporel significativement différente de celle observée chez les souris CTL. Par ailleurs, aucune différence significative entre les groupes expérimentaux n'est décelée en ce qui concerne le poids des reins ainsi que la prise de nourriture et d'eau.

Tableau 3 : Evolution du poids corporel, du poids des reins et de la prise de nourriture et d'eau dans les groupes CTL et CTL+L-Arg aux jours 5, 10 et 20.

	Evolution du poids corporel - %	Poids des reins - mg	Prise de nourriture – g/24h	Prise d'eau – ml/24h
J5				
CTL	1,81 ± 1,12	156,9 ± 6,4	3,49 ± 0,37	4,39 ± 0,68
CTL+L-Arg	2,68 ± 1,05	155,8 ± 2,25	4,07 ± 0,37	5,91 ± 0,94
J10				
CTL	8,55 ± 2,04	163,7 ± 6,4	3,98 ± 0,24	5,33 ± 0,39
CTL+L-Arg	1,97 ± 0,35*	160,2 ± 5,74	3,36 ± 0,17	4,81 ± 0,23
J20				
CTL	9,67 ± 1,24	152,2 ± 3,54	4,11 ± 0,37	6,21 ± 0,38
CTL+L-Arg	6,46 ± 2,25	164,4 ± 9,01	4,13 ± 0,51	5,65 ± 0,27

Les valeurs sont des moyennes ± SEM. N=6 pour chaque groupe. Analyses statistiques : Two Way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Holm-Sidak : * $p < 0,05$ vs CTL.

1.3. Fonction rénale

La fonction rénale a été évaluée en mesurant la diurèse ainsi que l'osmolarité et la concentration en créatinine urinaire dans les deux groupes CTL et CTL+L-Arg. Comme l'indiquent les valeurs mentionnées dans le **Tableau 4**, aucune différence significative n'a été mise en évidence au cours du protocole.

Tableau 4 : Valeurs de diurèse, d'osmolarité urinaire et de concentration en créatinine urinaire des groupes CTL et CTL+L-Arg aux jours 5, 10 et 20.

	Diurèse – ml/24h	Osmolarité urinaire – mOsm/kg	Créatinine urinaire - mg/dl
J5			
CTL	0,43 ± 0,10	5034 ± 95,55	136,9 ± 6,49
CTL+L-Arg	0,61 ± 0,21	5014 ± 480,40	118,1 ± 11,18
J10			
CTL	0,59 ± 0,13	4879 ± 382,20	109,7 ± 11,90
CTL+L-Arg	0,43 ± 0,07	5384 ± 580,10	113,6 ± 8,21
J20			
CTL	0,79 ± 0,20	4706 ± 414,60	127,1 ± 15,47
CTL+L-Arg	0,75 ± 0,11	5703 ± 595,80	118,5 ± 14,72

Les valeurs sont les moyennes ± SEM. N=6 pour chaque groupe. Analyses statistiques : Two Way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Holm-Sidak : NS.

1.4. Analyses histologiques

Des analyses histologiques ont été réalisées sur les coupes de reins afin d'évaluer la présence d'altérations morphologiques. Au terme de ces observations, nous constatons qu'aucune altération rénale n'est apparue dans les deux groupes de souris dont les reins affichent une morphologie identique (**Figure 11**).

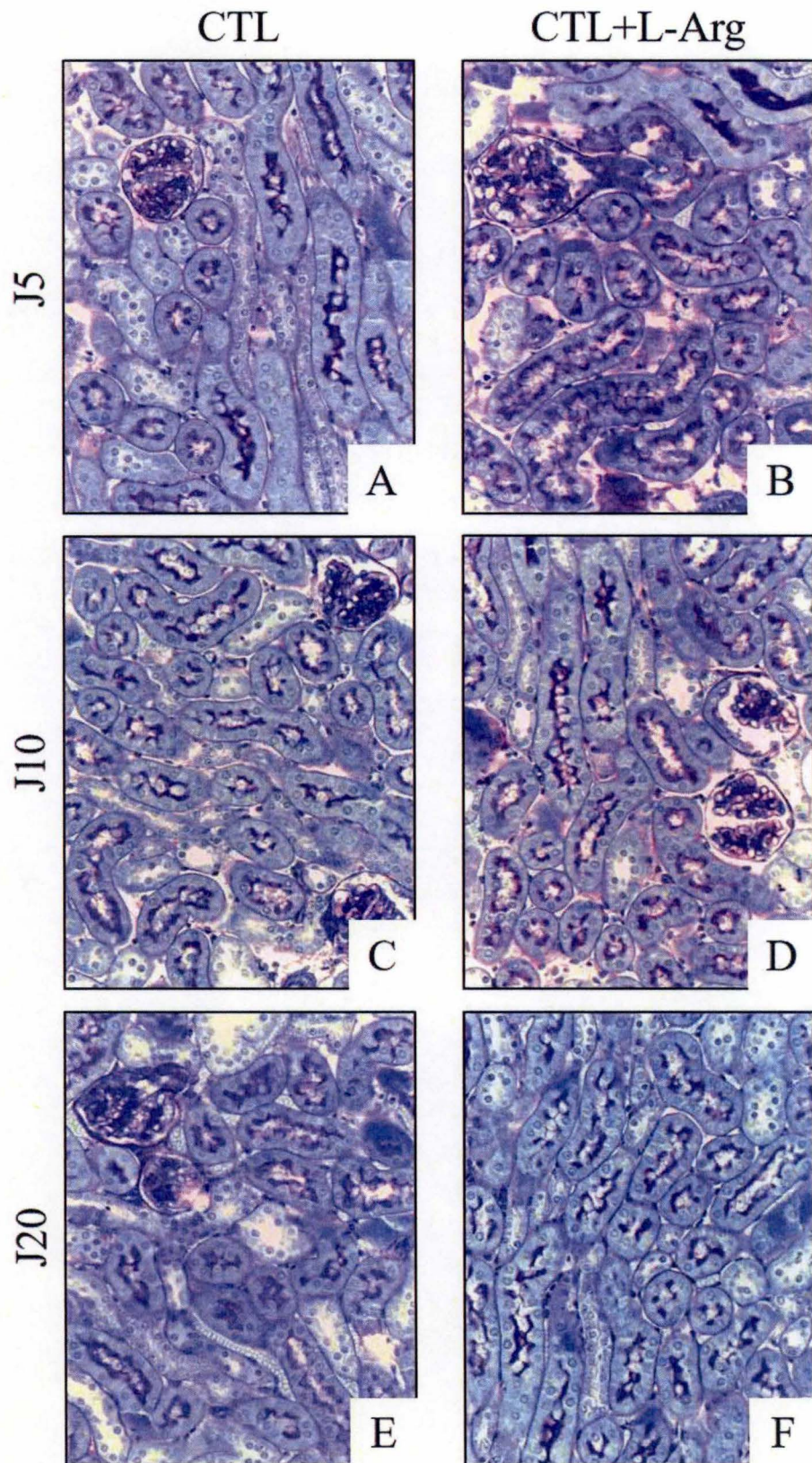


Figure 11 : Coloration au PAS suivie d'une coloration à l'hémalun et au bleu de luxol du tissu rénal des souris CTL (A,C,E) et CTL+L-Arg (B,D,F) obtenus 5 (A,B), 10 (C,D) et 20 (E,F) jours après la première injection de AA. Grossissement 400x.

Au vu des résultats obtenus dans cette première partie, nous pouvons en conclure qu'il n'y a aucune différence significative des principaux paramètres étudiés dans les deux groupes, hormis l'excrétion urinaire des NOx et GMPc. C'est pour cette raison que seules les données expérimentales du groupe de souris CTL ont été reprises en considération pour servir de valeurs contrôles dans les analyses ultérieures.

2. Partie 2 : Etude des effets de l'administration de L-Arg dans la phase chronique de la NAA

La deuxième partie de notre étude vise à étudier les effets de l'administration de L-Arg chez les souris traitées aux AA et ce, à différents moments du protocole (J5, J10 et J20). Pour ce faire, nous avons comparé les données obtenues dans les trois groupes suivants : les souris contrôles (CTL), les souris recevant uniquement des AA (AA) et les souris traitées aux AA recevant une administration de L-Arg (AA+L-Arg).

2.1. *Mesure de la biodisponibilité en NO*

La **Figure 12** illustre l'excrétion urinaire des NOx et du GMPc dans les trois groupes étudiés. La **Figure 12A** met en évidence une diminution significative de l'excrétion urinaire des NOx chez les souris AA en comparaison aux valeurs obtenues chez les souris CTL ($p < 0,05$ vs CTL) et ce, du J5 au J20. En outre, le traitement à la L-Arg améliore significativement l'excrétion urinaire des NOx chez les souris traitées aux AA ($p < 0,05$ vs AA) pour chaque timing. En parallèle, on observe une diminution significative de l'excrétion urinaire du GMPc dans le groupe AA, par rapport aux valeurs du groupe CTL, cette différence étant maintenue pendant toute la durée du protocole ($p < 0,05$ vs CTL). Chez les souris AA+L-Arg, l'excrétion urinaire du GMPc augmente de manière significative aux J10 et 20 ($p < 0,05$ vs AA) en comparaison avec les valeurs obtenues chez les souris AA (**Figure 12B**).

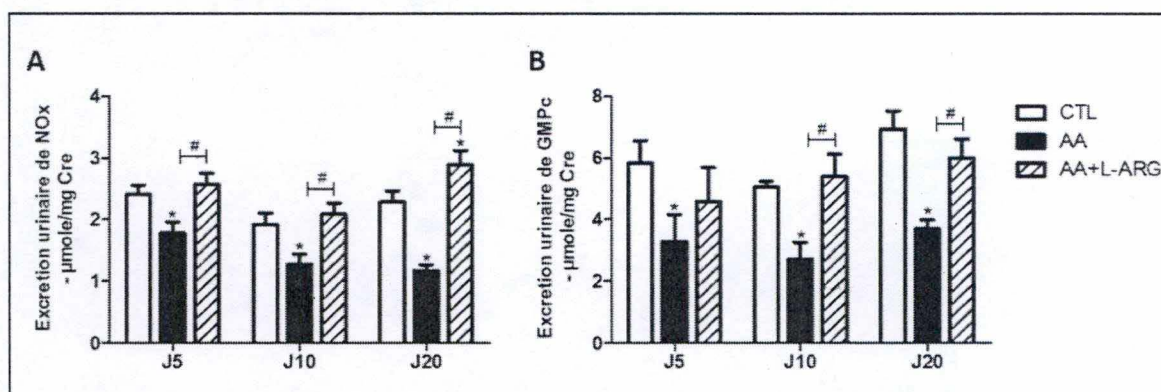


Figure 12 : Analyse de l'excrétion urinaire de NOx ($\mu\text{mole/mg}$ Créatinine) (A) et de GMPc ($\mu\text{mole/mg}$ Créatinine) (B) des souris CTL, AA et AA+L-Arg, 5, 10 et 20 jours après la première injection de AA. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM. $N=6$ pour chaque groupe. Analyses statistiques : Two Way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Holm-Sidak : * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs AA.

2.2. *Données métaboliques*

Le **Tableau 5** reprend les paramètres métaboliques tels que l'analyse de l'évolution du poids corporel, du poids des reins ainsi que de la prise de nourriture et d'eau. En ce qui concerne l'évolution du poids corporel, il s'avère qu'elle est influencée par le traitement aux AA. Cependant, un traitement à la L-Arg n'a aucun impact sur cette évolution. En effet, les animaux traités aux AA (groupes AA et AA+L-Arg) affichent un poids corporel significativement inférieur à celui des animaux CTL aux J10 et J20 ($p < 0,05$ vs CTL). En outre, pour tous les timings, le poids des reins ainsi que les quantités de nourriture et d'eau consommées ne montrent pas de différences significatives dans les trois groupes étudiés.

Tableau 5 : Evolution du poids corporel, du poids des reins et de la prise de nourriture et d'eau dans les groupes CTL, AA et AA+L-Arg aux jours 5, 10 et 20.

	Evolution du poids corporel - %	Poids des reins - mg	Prise de nourriture - g/24h	Prise d'eau - ml/24h
J5				
CTL	$1,81 \pm 1,12$	$156,9 \pm 6,40$	$3,49 \pm 0,37$	$4,39 \pm 0,68$
AA	$-1,31 \pm 2,63$	$139,3 \pm 3,74$	$3,44 \pm 0,57$	$5,09 \pm 1,13$
AA+L-Arg	$-3,54 \pm 0,97$	$150 \pm 3,40$	$3,68 \pm 0,14$	$5,31 \pm 0,68$
J10				
CTL	$8,55 \pm 2,04$	$163,7 \pm 6,40$	$3,98 \pm 0,24$	$5,33 \pm 0,39$
AA	$-6,02 \pm 1,06^*$	$143,3 \pm 3,93$	$3,39 \pm 0,35$	$5,47 \pm 0,41$
AA+L-Arg	$-7,25 \pm 1,30^*$	$138,3 \pm 4,21$	$3,39 \pm 0,36$	$4,91 \pm 0,17$
J20				
CTL	$9,67 \pm 1,24$	$152,2 \pm 3,54$	$4,11 \pm 0,37$	$6,21 \pm 0,38$
AA	$-2,82 \pm 2,27^*$	$153,7 \pm 6,12$	$4,34 \pm 0,13$	$5,98 \pm 0,60$
AA+L-Arg	$-3,78 \pm 0,88^*$	$165,9 \pm 4,66$	$4,05 \pm 0,09$	$5,57 \pm 0,57$

Les valeurs sont des moyennes \pm SEM. $N=6$ pour chaque groupe. Analyses statistiques : Two Way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Holm-Sidak : * $p < 0,05$ vs CTL.

2.3. *Fonction rénale*

Afin de caractériser la fonction rénale, plusieurs paramètres urinaires ont été étudiés tels que la diurèse, l'osmolarité urinaire, la créatininémie, l'urémie et la protéinurie. La **figure 13A** illustre la diurèse observée dans les différents groupes. Au J5, la diurèse ne diffère pas entre les groupes

expérimentaux, alors qu'à partir du J10, une augmentation progressive et significative de la diurèse est observée chez les animaux traités aux AA en comparaison aux souris contrôles ($p < 0,05$ vs CTL). Cependant, le traitement à la L-Arg réduit de manière significative la polyurie induite par les AA ($p < 0,05$ vs AA), même si cette valeur reste significativement plus élevée que celle des souris contrôles au J20 ($p < 0,05$ vs CTL). En outre, le traitement aux AA a également pour effet de diminuer significativement l'osmolarité urinaire et ce, du J5 au J20. Néanmoins, ce graphe montre que lorsque ces souris sont traitées avec de la L-Arg, la diminution de l'osmolarité induite par les AA est nettement atténuée ($p < 0,05$ vs AA) (**Figure 13B**).

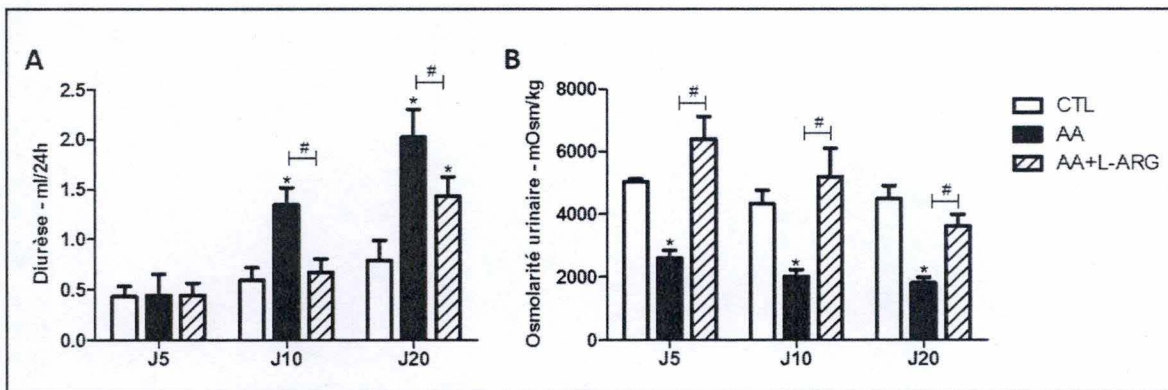


Figure 13 : Analyse de la diurèse (ml/24h) (A) et de l'osmolarité urinaire (mOsm/kg) (B) des souris CTL, AA et AA+L-Arg, 5, 10 et 20 jours après la première injection de AA. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM. N=6 pour chaque groupe. Analyses statistiques : Two Way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Holm-Sidak : * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs AA.

Afin de compléter nos observations, la fonction rénale a été évaluée en mesurant la concentration plasmatique en créatinine (**Figure 14A**). Ce graphe met en évidence une augmentation significative de la concentration en créatinine plasmatique dans le groupe de souris AA par rapport aux souris CTL ($p < 0,05$ vs CTL) aux J10 et 20. Par ailleurs, le traitement à la L-Arg permet de rétablir la concentration plasmatique en créatinine à des valeurs physiologiques chez les souris AA au J10 ($p < 0,05$ vs AA). De plus, aucune différence significative n'est observée entre les trois groupes expérimentales même si la concentration en créatinine plasmatique a tendance à augmenter dans chez les souris AA et AA+L-Arg. En ce qui concerne la concentration plasmatique en urée, celle-ci est similaire dans tous les groupes au J5, tandis qu'au J10, elle s'élève de manière significative dans le groupe AA par comparaison au groupe CTL ($p < 0,05$ vs CTL). Le traitement à la L-Arg atténue de manière significative l'augmentation de la concentration en urée dans le sang induit par l'intoxication aux AA sans pour autant obtenir des valeurs physiologiques. Au J20, l'urémie observée dans le groupe AA est moins élevée qu'au J10 et est similaire à celle mesurée dans le groupe AA+L-Arg, mais ces valeurs restent tout de même supérieures à celle des souris CTL sans pour autant atteindre des valeurs significatives (**Figure 14B**). La **Figure 14C** illustre l'excrétion urinaire de protéines. Elle met en évidence une protéinurie chez les souris traitées aux AA au J5 ($p < 0,05$ vs CTL) qui tend à diminuer progressivement par la suite jusqu'à ne plus atteindre une différence significative avec les souris CTL au J20. Le traitement à la L-Arg ne diminue pas la protéinurie induite par l'intoxication aux AA.

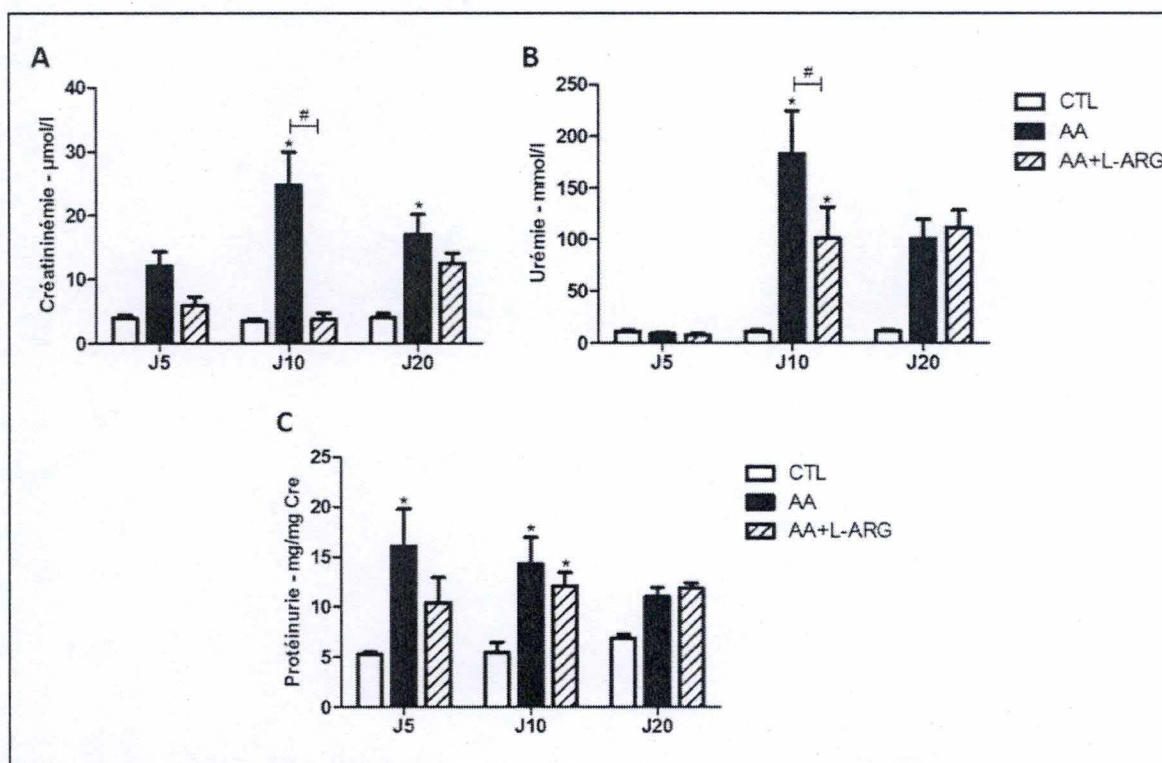


Figure 14 : Analyse de la créatininémie (μmole/l) (A), de l'urémie (mmol/l) (B) et de la protéinurie (mg/mg créatinine) (C) des souris CTL, AA et AA+L-Arg, 5, 10 et 20 jours après la première injection de AA. Les valeurs sont des moyennes ± SEM. N=6 pour chaque groupe. Analyses statistiques : Two Way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Holm-Sidak : * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs AA.

2.4. Caractérisation des lésions tubulaires et de la prolifération cellulaire

2.4.1. Analyses histologiques

L'analyse histologique du tissu rénal a été effectuée grâce à une coloration au PAS et ce, dans le but de caractériser les altérations morphologiques (**Figure 15**). Les **Figures 15A, D et G** illustrent les tissus rénaux des souris CTL pour chaque timing, qui ne présentent aucune atteinte tubulaire. En revanche, l'analyse histologique des reins des souris traitées aux AA révèle la présence de lésions tubulaires principalement localisées au niveau des tubules proximaux, tant au niveau du cortex que de l'OSOM. Ces lésions semblent s'accroître progressivement du J5 au J20 (**Figure 15B, E et H**). En effet, au J5, les cellules des tubules proximaux sont nécrotiques et n'adhèrent plus correctement à la membrane basale, elles présentent également une perte progressive de la bordure en brosse (**Figure 15B**). Au J20, les tubules nécrotiques ont évolué en tubules kystiques totalement dépourvus de leurs cellules (**Figure 15H**). Tandis qu'au J10, on constate une transition entre les deux types de dommages tubulaires. En effet, on observe aussi bien des tubules nécrotiques que des tubules kystiques. De plus, les lésions tubulaires induites par les AA sont atténuées avec le traitement à la L-Arg (**Figure 15C, F et I**). On remarque en effet à l'examen des coupes que les tubules sont moins lésés. Cependant, c'est une faible différence et il est donc nécessaire de confirmer ces observations. C'est la raison pour laquelle un score caractérisant le pourcentage de lésions tubulaires a été établi. Ce score est nul pour les souris CTL étant donné que les reins ne présentent aucune lésion. En revanche, les souris traitées aux AA affichent un pourcentage de

de lésions tubulaires significativement plus élevé en comparaison aux souris CTL ($p < 0,05$ vs CTL). L'apport en L-Arg, quant à lui, a pour effet de réduire le pourcentage de lésions de manière significative aux J5 et J20 ($p < 0,05$ vs AA) (**Figure 16**).

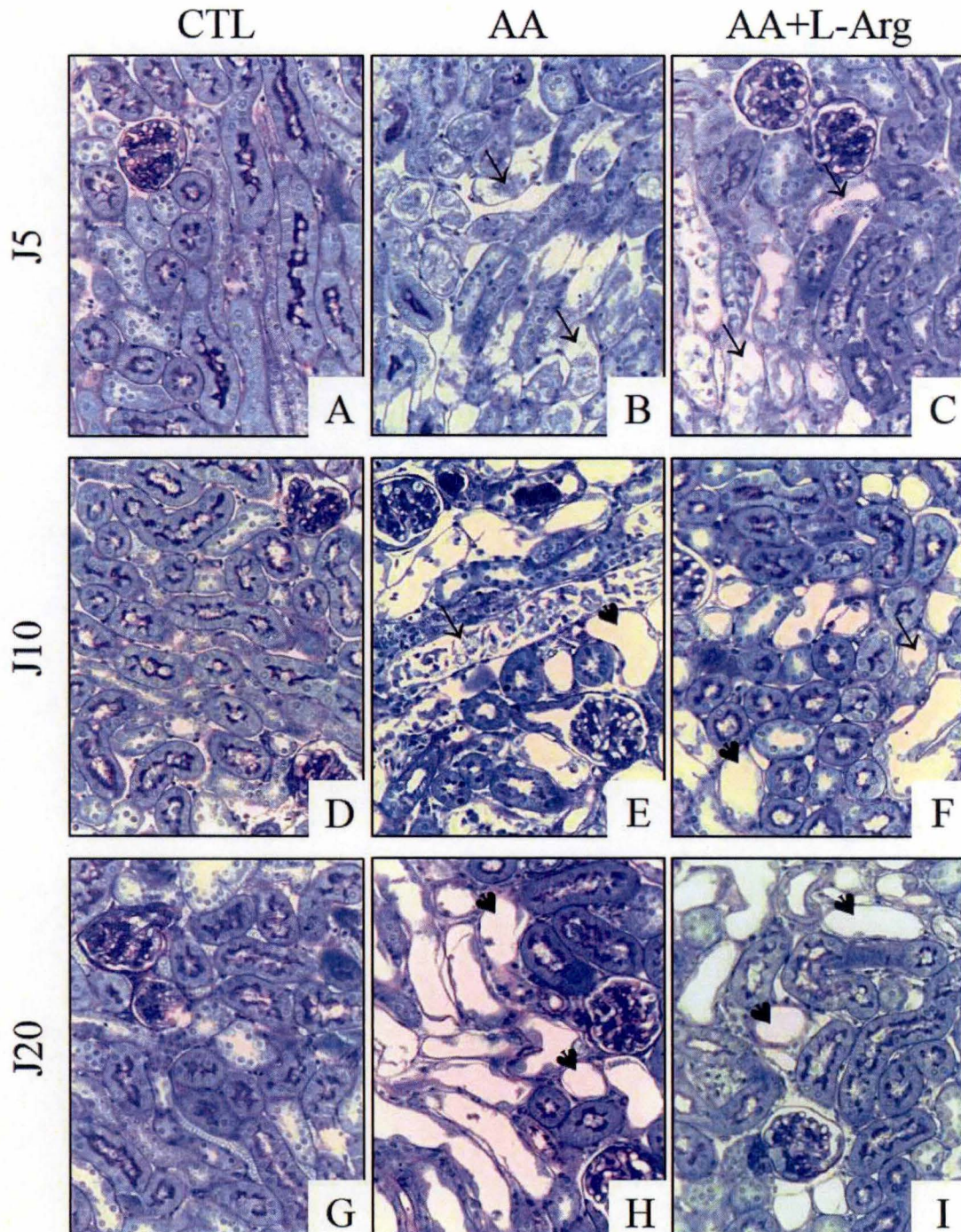


Figure 15 : Coloration au PAS suivie d'une coloration à l'hémalum et au bleu de luxol des tissus rénaux des souris CTL (A,D,G), AA (B,E,H) et AA+L-Arg (C,F,I) obtenus 5 (A,B,C), 10 (D,E,F) et 20 (G,H,I) jours après la première injection de AA. Grossissement 400x.

→ Tubules nécrotiques avec des débris cellulaires dans la lumière + perte progressive de la bordure en brosse

➤ Tubules Kystiques

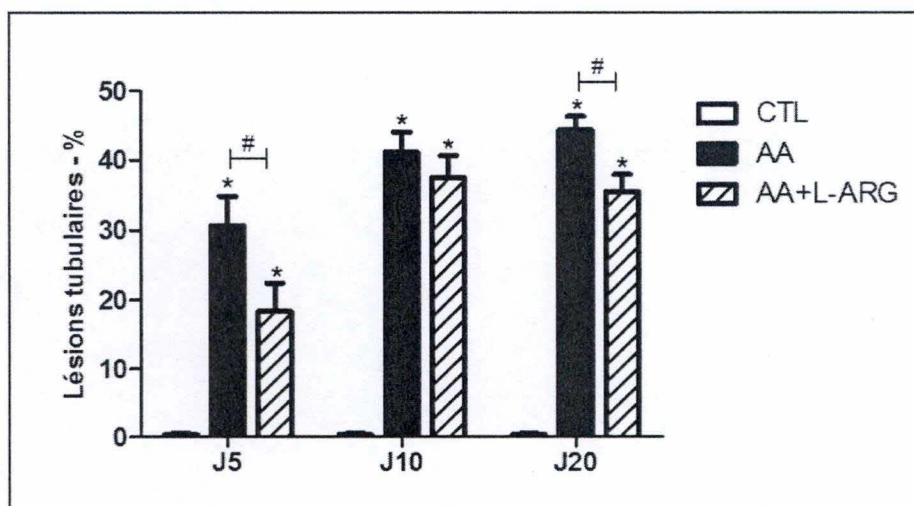


Figure 16 : Pourcentage de lésions tubulaires dans les tissus rénaux des souris CTL, AA et AA+L-Arg obtenus 5, 10 et 20 jours après la première injection de AA. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM. $N=6$ pour chaque groupe. Analyses statistiques : Two Way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Holm-Sidak : * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs AA.

2.4.2. Evaluation du processus de prolifération cellulaire

La **Figure 17** illustre le pourcentage de cellules tubulaires positives au PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) dans les différents groupes expérimentaux. Ce marquage immunohistochimique permet l'évaluation du processus de prolifération cellulaire. Les résultats obtenus indiquent une augmentation significative du pourcentage de cellules exprimant le PCNA en cas d'intoxication aux AA à partir du J10 ($p < 0,05$ vs CTL). De plus, le traitement à la L-Arg n'a pas d'influence sur ce paramètre.

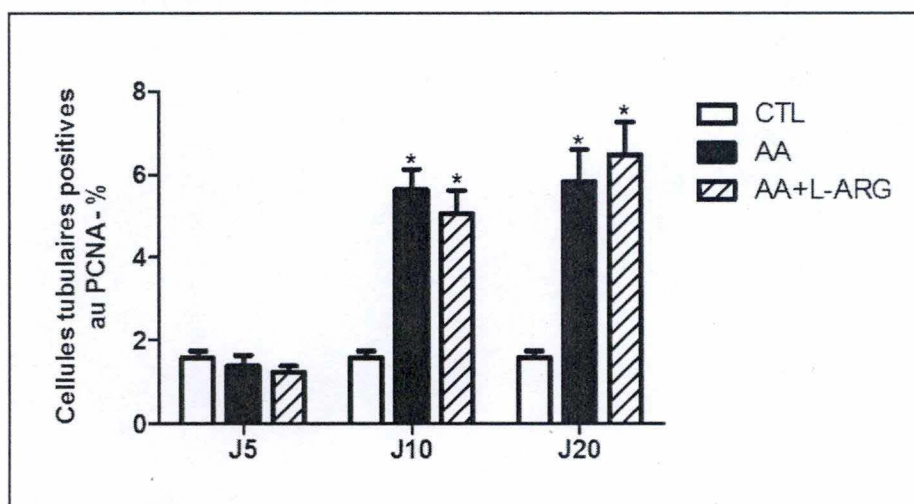


Figure 17 : Pourcentage de cellules tubulaires positives au PCNA dans les tissus rénaux des souris CTL, AA et AA+L-Arg, 5, 10 et 20 jours après la première injection de AA. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM. $N=6$ pour chaque groupe. Analyses statistiques : Two Way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Holm-Sidak : * $p < 0,05$ vs CTL.

2.5. Caractérisation de l'inflammation

Afin d'évaluer l'importance de la réponse inflammatoire dans ce modèle de néphrotoxicité, nous avons mesuré les niveaux d'expression relative d'ARNm de l'interleukine-1 β (IL-1 β), de l'interleukine-6 (IL-6), ainsi que celle de MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) dans le tissu rénal des différents groupes expérimentaux. Un comptage du nombre de macrophages présents dans le milieu interstitiel a également été réalisé pour les différents groupes expérimentaux. La **Figure 18A** illustre une augmentation significative de l'expression relative d'ARNm de l'IL-1 β au J10 et au J20 dans le groupe AA par rapport au groupe CTL. Lorsque les souris AA sont traitées avec de la L-Arg, une réduction significative de l'expression relative de l'ARNm de l'IL-1 β est observée aux J10 et J20 ($p < 0,05$ vs AA). En ce qui concerne l'expression relative d'ARNm de l'IL-6, celle-ci est fortement augmentée chez les souris AA par comparaison aux souris CTL au J5 ($p < 0,05$ vs CTL) et tend à diminuer aux J10 et 20 tout en gardant des valeurs significativement supérieures à celles mesurées chez les animaux CTL. Chez les souris AA+L-Arg, cette expression est réduite de façon significative aux J5 et 10 ($p < 0,05$ vs AA) (**Figure 18B**). La mesure de l'expression relative d'ARNm de MCP-1 chez les souris AA met en évidence une augmentation statistique uniquement au J20 ($p < 0,05$ vs CTL). Alors qu'une administration de L-Arg n'a aucune influence sur l'expression relative d'ARNm de MCP-1 (**Figure 18C**). Enfin, l'analyse du nombre de macrophages est représentée par la **Figure 18D**. Ces résultats indiquent une augmentation progressive du nombre de macrophages tissulaires chez les souris AA qui devient significative aux J10 et 20 ($p < 0,05$ vs CTL). Toutefois, l'apport de L-Arg atténue cette infiltration dans le tissu rénal au J10 ($p < 0,05$ vs AA).

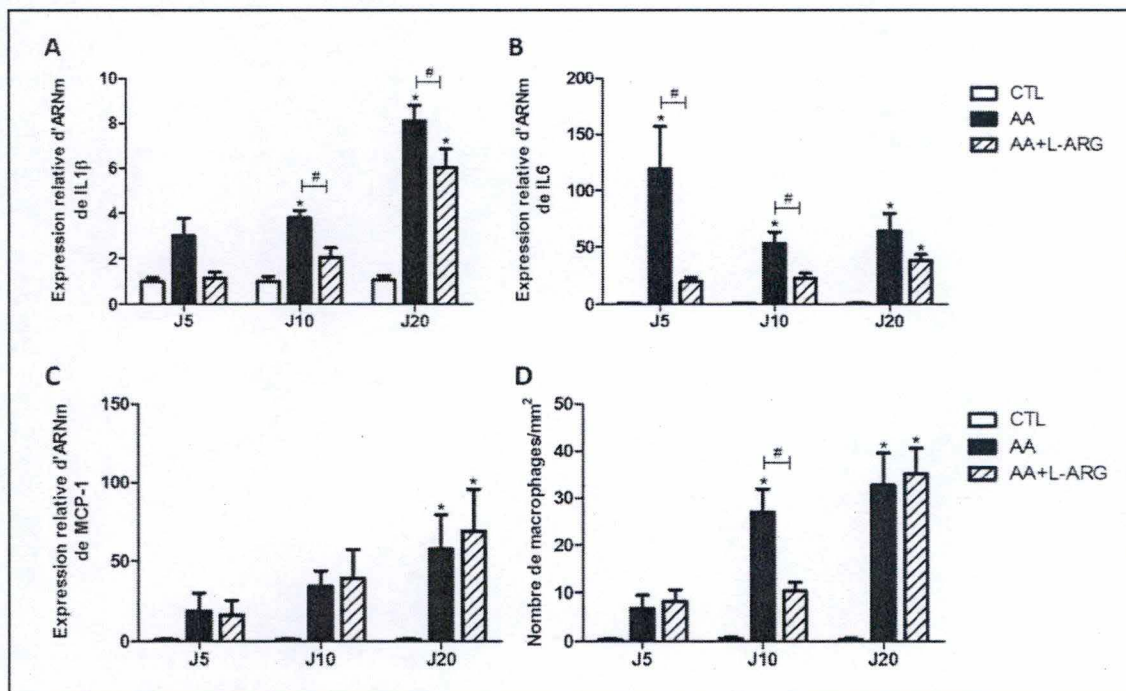


Figure 18 : Expression relative d'ARNm de l'IL-1 β (A), de l'IL-6 (B) et de MCP-1 (C) au sein des tissus rénaux des souris CTL, AA et AA + L-Arg, 5, 10 et 20 jours après la première injection de AA. Quantification du nombre de macrophages/mm² (D) dans le milieu interstitiel des reins des souris CTL, AA et AA+L-Arg, 5, 10 et 20 jours après la première injection de AA. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM. N=6 pour chaque groupe. Analyses statistiques : Two Way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Holm-Sidak : * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs AA.

2.6. *Analyse du développement de la fibrose*

Pour finir, la fibrose interstitielle au sein du tissu rénal a été évaluée, celle-ci étant l'une des caractéristiques majeures de la phase chronique de la NAA. Pour ce faire, un marquage immunohistochimique de α SMA (Alpha Smooth Muscle Actin), un marqueur myofibroblastique, a été réalisé (**Figure 19**). A partir de celui-ci, une analyse morphométrique a été effectuée afin de quantifier le pourcentage de surface positive à α SMA (**Figure 20**). Comme l'illustre la **Figure 20**, le tissu rénal des souris CTL présente un faible pourcentage de surface positive à l' α SMA, correspondant essentiellement au marquage de cellules musculaires lisses de vaisseaux (**Figures 19A, D et G**). Chez les souris traitées aux AA, le marquage augmente et devient significativement supérieur à celui mesuré chez les souris CTL à partir du J10 ($p < 0,05$ vs CTL) (**Figure 20**), comme on le constate sur les images présentées aux **Figures 19B, E, et H**. En revanche, en cas de traitement complémentaire avec de la L-Arg, le marquage est fortement réduit dans les reins des souris AA+L-Arg ($p < 0,05$ vs AA) aux J10 et 20 (**Figures 19C, F, I et Figure 11**).

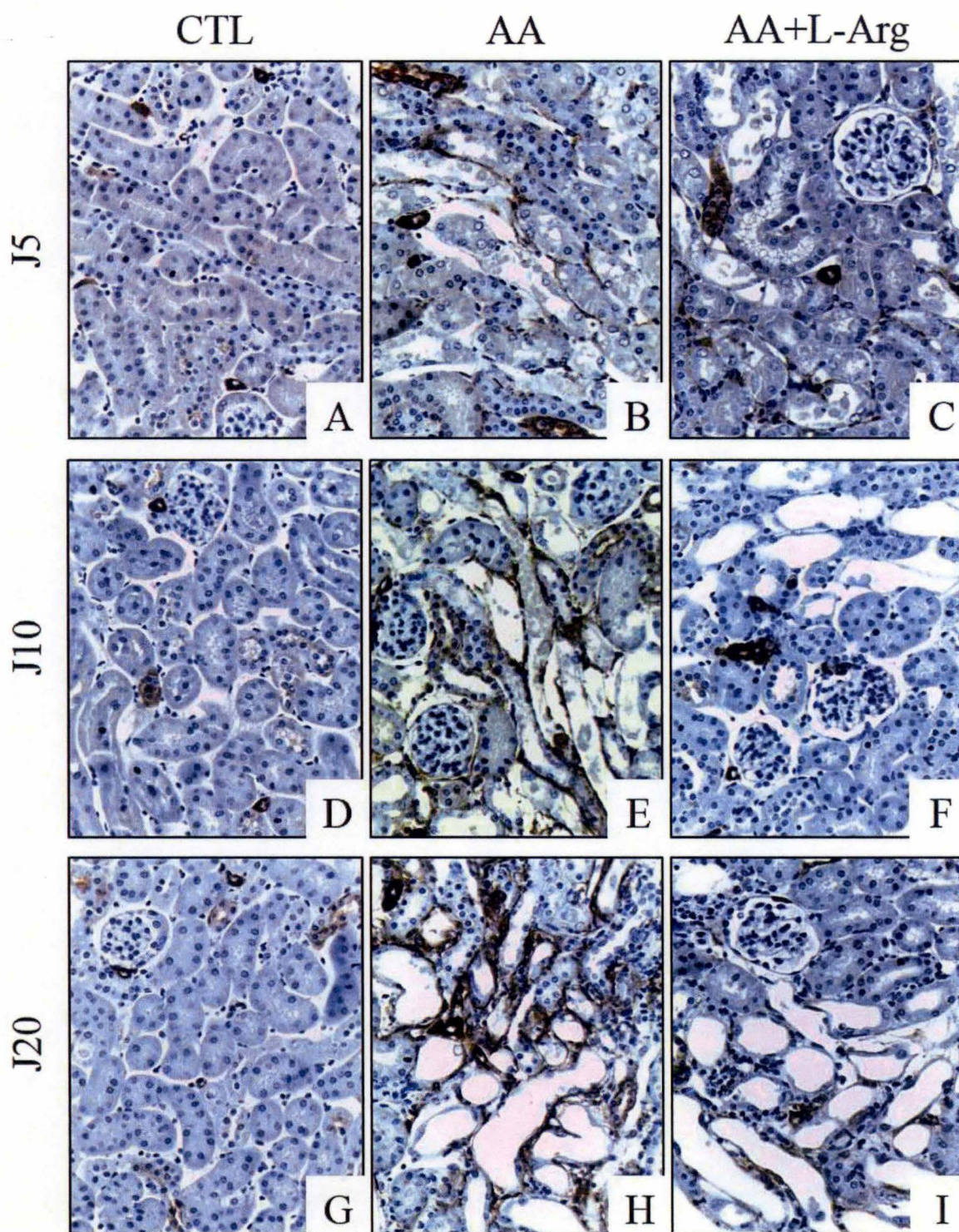


Figure 19 : Immunomarquage de l' α SMA suivi d'une coloration à l'hémalun et au bleu de luxol des tissus rénaux des souris CTL (A,D,G), AA (B,E,H) et AA+L-Arg (C,F,I) obtenus 5 (A,B,C), 10 (D,E,F) et 20 (G,H,I) jours après la première injection de AA. Grossissement 400x.

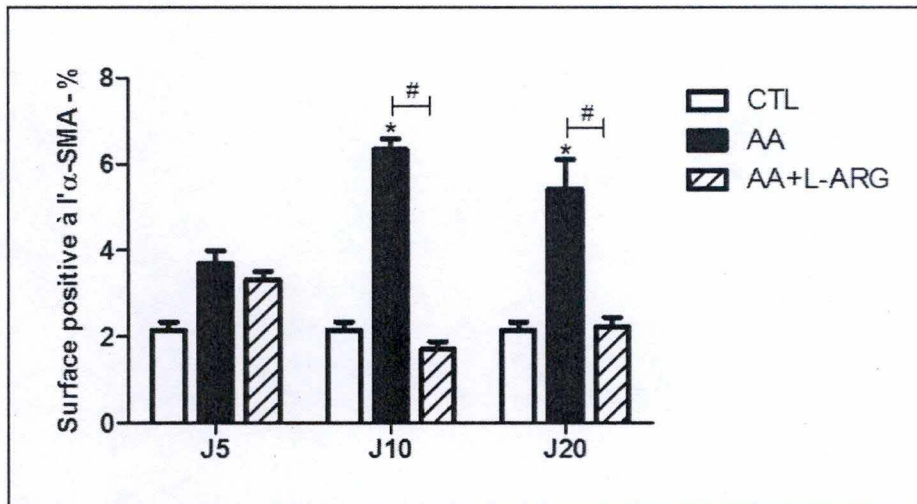


Figure 20 : Pourcentage de surface positive à l' α SMA dans les tissus rénaux des souris CTL, AA et AA+L-Arg obtenus 5, 10 et 20 jours après la première injection de AA. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM. N=6 pour chaque groupe. Analyses statistiques : Two Way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Holm-Sidak : * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs AA.

L'importance de la fibrose a également été évaluée grâce à l'analyse de la densité de la matrice extracellulaire et plus précisément de l'abondance des fibres de collagènes de type I (Col I) et III (Col III). Pour ce faire, les coupes histologiques de reins ont été colorées avec du rouge picrosirius et une analyse morphométrique a été réalisée afin de quantifier le pourcentage de surface positive au rouge picrosirius. On constate que les souris traitées avec des AA présentent un marquage plus important (**Figures 21B, E et H**) que les souris CTL (**Figures 21A, D et G**). Ces résultats sont d'ailleurs confirmés par l'analyse morphométrique (**Figure 22**). En effet, on observe dans le groupe AA que l'aire positive pour le rouge picrosirius tend à augmenter au début du protocole et atteint des valeurs significativement plus élevées aux J10 et 20 ($p < 0,05$ vs CTL). En outre, il s'avère qu'à partir du J10, le traitement à la L-Arg réduit fortement l'accumulation de collagène, comme illustré sur les images représentées dans les **Figures 21C, F et I**.

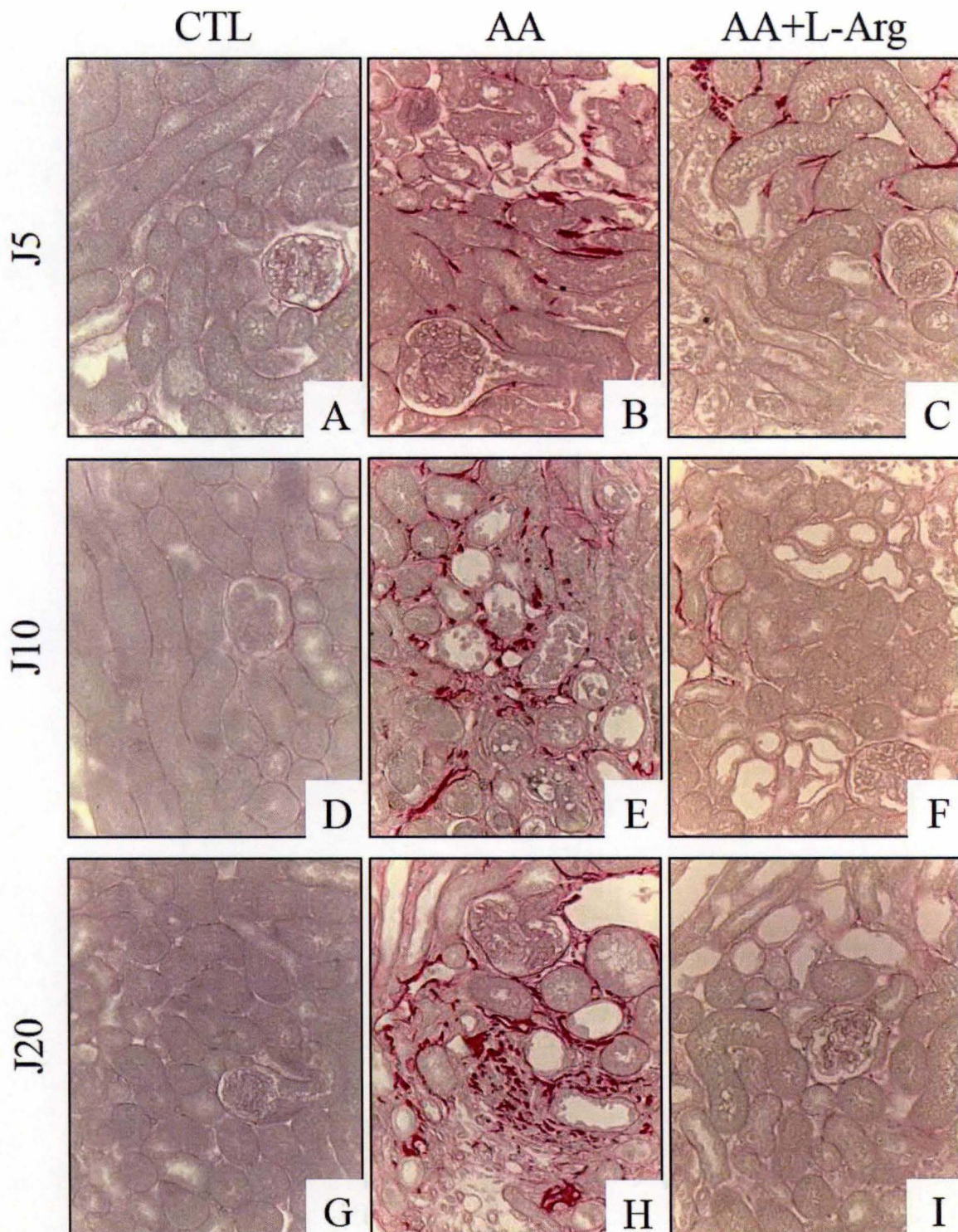


Figure 21 : Coloration au rouge picrosirius des tissus rénaux des souris CTL (A,D,G), AA (B,E,H) et AA+L-Arg (C,F,I) obtenus 5 (A,B,C), 10 (D,E,F) et 20 (G,H,I) jours après la première injection de AA. Grossissement 400x.

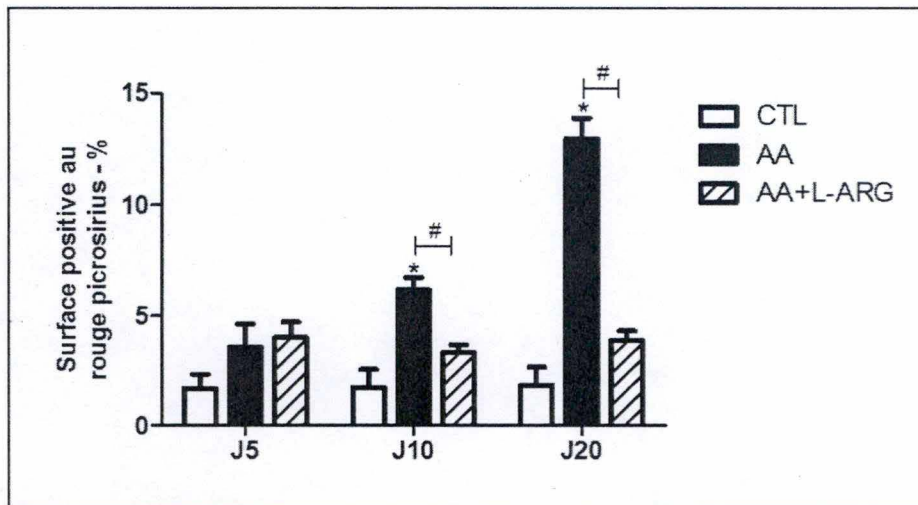


Figure 22 : Pourcentage de surface positive au rouge picrosirius dans les tissus rénaux des souris CTL, AA et AA+L-Arg obtenus 5, 10 et 20 jours après la première injection de AA. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM. N=6 pour chaque groupe. Analyses statistiques : Two Way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Holm-Sidak : * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs AA.

Enfin, ces résultats ont été complétés en mesurant l'expression relative d'ARNm des fibres de Col I et III (**Figure 23**). On constate une augmentation croissante de l'expression relative de l'ARNm de Col I induite par l'intoxication aux AA qui devient statistiquement significative à partir du J10 en comparaison au groupe CTL ($p < 0,05$ vs CTL). Avec le traitement à la L-Arg, cette expression relative est réduite à partir du J10 ($p < 0,05$ vs AA), sans toutefois atteindre des valeurs physiologiques (**Figure 23A**). Par ailleurs, on constate également une augmentation significative de l'expression relative de l'ARNm du Col III chez les souris AA à partir du J10 ($p < 0,05$ vs CTL). En ce qui concerne les souris AA+L-Arg, une réduction statistiquement significative de l'expression du Col III est observée aux J10 et 20 (**Figure 23B**).

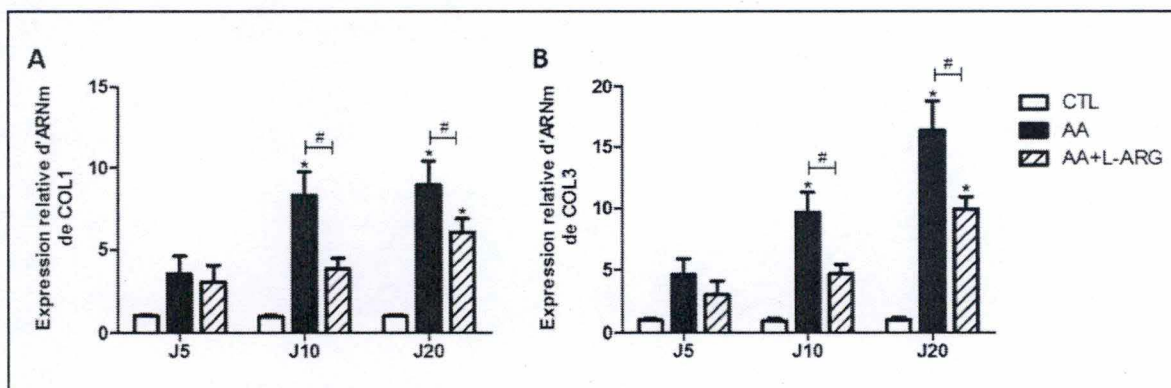


Figure 23 : Expression relative d'ARNm des fibres de Col I (A) et de Col III (B) au sein des tissus rénaux des souris CTL, AA et AA+L-Arg, 5, 10 et 20 jours après la première injection de AA. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM. N=6 pour chaque groupe. Analyses statistiques : Two Way ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Holm-Sidak : * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs AA.

Discussion

La NAA est une maladie rénale d'origine toxique induite par une exposition à des acides aristolochiques (AA). Un modèle expérimental développé chez le rat recevant des injections journalières de AA (10 mg/kg) par voie sous-cutanée pendant 5 ou 35 jours, a permis de mettre en évidence que cette pathologie est caractérisée par deux phases consécutives et interconnectées à savoir une phase aiguë et une phase chronique (*Lebeau et al, 2005*). Afin de pouvoir mettre en évidence les mécanismes sous-jacents de cette néphropathie, de nombreux modèles animaux ont déjà été établis (*Cosyns et al, 2001 ; Debelle et al, 2002 ; Sato et al, 2004*). En particulier, au sein de notre laboratoire, nous avons précédemment développé un modèle de NAA chez la souris C57BL/6.

L'objectif du mémoire est d'étudier, dans un modèle de souris NAA, la transition entre les phases aiguë et chronique, en ciblant l'implication du NO. En effet, il a été démontré qu'augmenter la biodisponibilité en NO via l'administration exogène de L-Arg à des souris atteintes de NAA au cours de la phase aiguë, permettait d'atténuer les lésions tubulaires et d'améliorer le débit de la filtration glomérulaire ainsi que la réabsorption tubulaire (*Declèves et al, 2015*). Des observations similaires ont également été rapportées dans d'autres modèles de pathologie rénale aiguë (*Schramm et al, 2002 ; Schneider et al, 2003*). Dès lors, la suite de notre approche expérimentale a consisté à administrer de la L-Arg en poursuivant nos expériences jusqu'à la phase chronique de la NAA, afin d'évaluer si l'augmentation de la biodisponibilité en NO peut également se révéler bénéfique à plus long terme. Pour ce faire, nous avons traité des souris C57BL/6 avec 3,5 mg/kg de AA (1 injection quotidienne en i.p. pendant 4 jours consécutifs) et nous avons également administré de la L-Arg (une semaine avant la première injection de AA et durant tout le protocole) dans l'eau de boisson (5%). Le choix de la dose et d'un pré-traitement à la L-Arg a été établi sur base de la littérature (*Kurus et al, 2005 ; Alam et al, 2013*). Le protocole s'est étalé sur une période de 20 jours après la première injection de AA dans le but d'induire des lésions rénales chroniques et des échantillons ont été récoltés aux J5, 10 et 20.

1. Partie 1 : Etude des effets de la L-Arg en conditions contrôles

La première partie de notre expérimentation a pour but de démontrer qu'un apport en L-Arg n'a pas d'impact physiologique en conditions contrôles et qu'elle induit une augmentation de la biodisponibilité en NO.

Le NO est caractérisé par un temps de demi-vie court étant donné sa réaction rapide avec différentes molécules (*Bradford et al, 2010*). L'une de ces voies principales nécessitant la présence d'oxygène est sa métabolisation rapide en nitrates/nitrites (NOx) qui sont par la suite excrétés dans les urines (*Csonka et al, 2015*). En outre, le NO est également à l'origine de l'activation de nombreuses cibles moléculaires, dont la principale est la guanylate cyclase soluble (GCs). Dès lors, la détection de ces produits (NOx et GMPc) permet de mesurer de manière indirecte la production de NO. Sur base de ce type d'analyses, nous avons observé une augmentation de l'excrétion urinaire des NOx ainsi que du GMPc chez les souris traitées à la L-Arg.

En ce qui concerne les données générales, une faible évolution du poids corporel des souris traitées à la L-Arg par rapport aux souris CTL est constatée au J10. Celle-ci peut être

due à un stress subi lors de la mise en cage métabolique. De plus, étant donné le petit nombre de souris par groupe ($n=6$), les variabilités sont plus facilement mises en évidence. Mise à part cette différence, aucun des autres paramètres métaboliques et urinaires étudiés n'ont été affectés par le traitement à la L-Arg. De plus, les analyses histologiques ne révèlent pas de modification morphologique du tissu rénal.

En conclusion de cette première partie de l'étude, les résultats nous confirment bien que la L-Arg induit une augmentation de la biodisponibilité en NO, mesurable par l'augmentation de l'excrétion urinaire des NOx et du GMPc. Des données similaires ont également été observées dans la littérature, mettant en évidence une augmentation de la production des NOx et du GMPc suite à un traitement à la L-Arg (*Bode-Boger et al, 1996 ; Nesher et al, 2013*). En revanche, il n'y a aucune différence entre les souris contrôles et les souris traitées avec de la L-Arg en ce qui concerne les autres paramètres étudiés. Par conséquent, la L-Arg n'a pas d'effets indésirables et inattendus en conditions contrôles.

2. Partie 2 : Etude des effets de l'administration de L-Arg dans la phase chronique de la NAA

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons étudié l'impact d'un traitement à la L-Arg sur la NAA au cours de sa phase chronique. Pour ce faire, nous avons donc analysé la fonction et la morphologie rénales 5, 10 et 20 jours après la première injection de AA. Ces timings ont été choisis dans le but de déterminer l'influence de l'administration de la L-Arg durant la transition de la phase aiguë à la phase chronique. En effet, il a été montré à partir de modèles expérimentaux que la phase aiguë de la néphropathie apparaissait après 3 à 10 jours de traitement aux AA, alors que la phase chronique se manifestait après 14 jours (*Declèves et al, 2015*).

Tout d'abord, l'analyse de la biodisponibilité en NO dans notre modèle nous a apporté des résultats en concordance avec ceux publiés par Wen et son équipe (2008). En effet, les analyses de l'excrétion urinaire des NOx et du GMPc ont pu mettre en évidence une diminution de la biodisponibilité en NO qui fut toujours constatée après 20 jours. Comme mentionné précédemment, ce délai coïncide bien avec la phase chronique de la NAA. Ces résultats sont cohérents avec les données rapportées chez des patients souffrant d'insuffisance rénale chronique où une diminution de la production de NO est constatée (*Blum et al, 1998*). Les causes d'une réduction de la production de NO font l'objet de nombreuses hypothèses, dont les plus fréquentes sont l'inactivation du NO due à une augmentation du stress oxydatif ou encore l'augmentation de la synthèse d'inhibiteurs endogènes à l'origine de l'inactivation des NOS (*Baylis, 2008*). Nos analyses tendent à montrer que la biodisponibilité du NO est restaurée suite à un apport en L-Arg, étant donné que l'excrétion urinaire des NOx et du GMPc atteignent des concentrations proches des valeurs physiologiques durant l'entièreté du protocole.

La suite de notre expérimentation vise à analyser l'évolution de quelques paramètres métaboliques. Dans un premier temps, l'évolution du poids corporel des souris de chaque groupe a été suivie tout au long du protocole expérimental. Les résultats obtenus suggèrent que les AA ont une influence sur ce paramètre. En effet, les souris traitées aux AA affichent une évolution négative du poids corporel par rapport aux souris CTL à partir du J10. Elle tend toutefois à s'améliorer à J20, ce qui est sans doute lié à leur croissance car l'évolution du poids

corporel augmente faiblement par rapport à celui des souris contrôles. Des expériences effectuées chez des rats sont en concordance avec ces constations. En effet, ces rats traités aux AA montraient une faible évolution du poids corporel par rapport aux rats contrôles et ce, durant tout le protocole (*Debelle et al, 2002 ; Chan & Cai, 2008*). Par ailleurs, on remarque qu'un traitement à la L-Arg n'a aucune influence sur cette régression de l'évolution du poids corporel induite par la NAA. Malgré cette diminution du poids corporel, on ne constate aucun changement dans la prise de nourriture entre les différents groupes. Cela laisse penser que les reins ne sont pas la seule cible des AA et qu'une atteinte plus générale de l'organisme peut être envisagée. C'est en effet le cas dans d'autres modèles de NAA tels que chez le rat ou le lapin où des atteintes gastriques sont constatées (*Mengs et al, 1982 ; Cosyns et al, 2001*). Il n'y a également aucune différence significative entre les groupes en ce qui concerne la consommation en eau et le poids des reins. Pourtant, si on s'en réfère à la littérature, des reins plus petits sont observés chez les patients NAA mais aussi chez des souris C57BL/6 ayant reçu des injections de AA (3 mg/kg) en i.p. et ce, tous les 3 jours pendant 6 semaines (*Reginster et al, 1997 ; Huang et al, 2013*). Dès lors, une diminution du poids des reins devrait être induite suite à une intoxication aux AA, ce qui n'est pas le cas ici. Cette différence entre notre étude et cette dernière (*Huang et al, 2013*) peut s'expliquer par le suivi de la pathologie qui est plus long par rapport à notre étude.

Afin d'identifier des modifications de la fonction rénale, certains paramètres urinaires tels que la diurèse et l'osmolarité urinaire ont été mesurés. Malgré une consommation d'eau normale, les souris traitées aux AA présentent une augmentation de la diurèse qui n'est apparue qu'à partir du 10^{ème} jour après la première injection de AA. Cela correspond à une augmentation de l'élimination de l'eau par les reins dans les urines : ce phénomène s'appelle la polyurie. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par plusieurs groupes qui ont constaté chez des rats traités avec des AA, une augmentation du volume urinaire après 7 à 8 jours de traitement (*Cui et al. 2005 ; Chan et al. 2008*). En ce qui concerne l'osmolarité urinaire, nos résultats mettent en évidence une diminution de celle-ci chez les souris AA et ce, tout au long du protocole. Les valeurs de diurèse et d'osmolarité obtenues chez ces animaux sont à mettre en corrélation car lors d'une polyurie, l'urine est moins concentrée étant donné qu'il y a moins de solutés par litre d'eau excrété (*Silverthorn, 2007*). C'est également ce qui a été constaté chez le lapin ayant reçu des injections i.p. de AA (0,1 mg/kg) 5 jours par semaines pendant 17 ou 21 mois (*Cosyns et al. 2001*). De plus, nos données expérimentales indiquent qu'un apport en L-Arg a un impact positif en atténuant la diurèse et en augmentant l'osmolarité urinaire induites par l'intoxication aux AA, comme nous l'avons déjà constaté précédemment (*Declèves et al, 2015*).

Dans notre protocole expérimental, une augmentation de l'excrétion urinaire de protéines est induite par l'intoxication aux AA dès le J5 et tend ensuite à diminuer légèrement aux J10 et 20. Ces résultats suggèrent l'apparition de dommages rénaux qui surviennent assez rapidement après la première injection de AA, en concordance avec les résultats publiés par Lebeau et al (2005). D'après ce qui est montré dans la littérature, la protéinurie induite par les AA est due à une excrétion massive de protéines de faible poids moléculaires tels que la protéine de liaison au rétinol, l' α 1-microglobuline et la β 2-microglobuline qui sont normalement réabsorbées au niveau des tubules proximaux (*Kabanda et al, 1995*). En ce qui concerne l'implication du NO dans notre modèle, il a tendance à induire une diminution de l'excrétion des protéines dans les urines uniquement aux J5 et 10, sans pour autant atteindre des valeurs significatives.

Enfin, les concentrations plasmatiques en créatinine et en urée ont également été déterminées afin d'évaluer la fonction rénale. Une importante accumulation plasmatique de ces deux solutés est observée au J10 et révèle ainsi une diminution du débit de la filtration glomérulaire. Notons qu'au terme du protocole, ces concentrations sont néanmoins réduites. A cet égard, une expérience réalisée chez la souris recevant des injections i.p. de AAI (2,5 mg/kg) 5 jours par semaine pendant deux semaines a montré au terme du protocole une augmentation de la créatininémie et de l'urémie. Ensuite, deux semaines après l'arrêt du traitement, ces concentrations plasmatiques étaient diminuées, suggérant une amélioration de la fonction rénale des souris due à l'arrêt de l'intoxication aux AA (*Sato et al, 2004*). Ces constatations pourraient expliquer que nous observions également une diminution de ces variables à la fin du protocole expérimental étant donné que la période d'observation des souris est prolongée 16 jours après l'arrêt des injections de AA. Enfin, administrer de la L-Arg aux souris AA a pour effet de fortement réduire les concentrations plasmatiques de ces deux valeurs observées au J10 et ce, jusqu'à atteindre des valeurs physiologiques en ce qui concerne la concentration plasmatique en créatinine. Cette constatation a également été établie par Mansour et al (2002) au cours d'études réalisées sur des rats ayant reçu des injections de cyclosporine en i.p. (15 mg/kg) afin d'induire une insuffisance rénale (*Mansour et al, 2002*). Au J20 de notre protocole, l'amélioration induite par un apport en L-Arg n'est plus constatée. Les valeurs élevées de la protéinurie, de la créatinémie ainsi que de l'urémie obtenues dans notre modèle de souris AA nous permettent de tirer la conclusion qu'il y a des altérations au niveau de la réabsorption tubulaire et de la filtration glomérulaire.

L'analyse des coupes histologiques nous a permis de constater que les glomérules semblaient être épargnés par l'intoxication aux AA. Si l'on s'en réfère à la littérature, d'autres chercheurs en sont arrivés à la même constatation (Debelle et al, 2002 ; Lebeau et al, 2005). Pourtant, les analyses de la créatininémie et de l'urémie nous ont permis de conclure que le débit de la filtration glomérulaire était altéré. Si ces perturbations ne sont pas induites par des altérations glomérulaires structurelles, elles pourraient découler de l'accumulation de fragments cellulaires dans la lumière tubulaire due au phénomène de nécrose, induisant ainsi une obstruction tubulaire à l'origine d'une augmentation de la pression intra-tubulaire (*Lebeau, 2006*).

Afin de se focaliser sur l'impact qu'exercent les AA sur les tubules proximaux, nous avons entrepris de caractériser les lésions structurelles. Pour ce faire, une coloration au PAS a été réalisée sur les coupes de reins dans le but de mettre en évidence les glycoprotéines. Celles-ci s'avèrent être abondantes au sein de la bordure en brosse des tubules proximaux. Par conséquent, on peut facilement démontrer des atteintes au niveau des cellules épithéliales des tubules proximaux. Alors que les structures rénales des souris contrôles ne présentent aucune modification morphologique, la coloration des reins de souris traitées aux AA permet de mettre en évidence des dommages au sein des tubules proximaux qui évoluent progressivement du J5 au J20. En effet, on peut distinguer des lésions rénales aiguës au J5 dont les caractéristiques sont similaires à celles décrites dans la littérature (*Nortier et al, 1997 ; Lebeau et al, 2005*), à savoir une perte de la bordure en brosse accompagnée d'une nécrose des cellules épithéliales avec l'apparition de fragments cellulaires dans la lumière des tubules. Par la suite, au J20, les tubules nécrotiques sont remplacés par des tubules kystiques présentant une membrane basale dénudée. Ces résultats sont semblables à ceux publiés dans une étude portant sur des rats qui ont reçu des injections quotidiennes de AA (10 mg/kg) par voie sous-cutanée pendant 5 ou 35 jours. Ces résultats ont permis de situer le développement de la phase aiguë entre les 4^{ème} et

5^{ème} jours du protocole, tandis que la phase chronique est caractérisée à partir du 7^{ème} jour jusqu'à la fin du protocole, le 35^{ème} jour (Pozdzik *et al*, 2008). En ce qui concerne les effets d'une administration en L-Arg sur la morphologie du tissu rénal, nous avons constaté qu'elle atténue les dommages causés par la NAA, comme l'attestent également les résultats obtenus par Kurus *et al*. (2005) dans un modèle de néphrotoxicité induit par la cyclosporine. En effet, les dommages tubulaires induits par des injections quotidiennes de cyclosporine (7,5 mg/kg) par voie sous-cutanée jusqu'au terme du protocole, étaient diminués suite à une administration de L-Arg (5 jours avant la première injection de cyclosporine et durant tout le protocole).

Les cellules tubulaires sont capables de se régénérer à la suite d'une atteinte toxique. En effet, lors de lésions rénales, les cellules intactes avoisinant les cellules nécrotiques, prolifèrent activement pour que l'intégrité des tubules puisse être maintenue et qu'il y ait une récupération des fonctions rénales (Toback, 1992). Dès lors, une analyse complémentaire visant à étudier le processus de régénération cellulaire a été effectuée grâce à un immunomarquage de PCNA qui est un co-facteur polymérase impliqué dans les processus de réparations des dommages à l'ADN (Kelman, 1997). Dans notre modèle, on remarque qu'une intoxication aux AA est à l'origine d'une augmentation de la régénération des cellules tubulaires via une stimulation importante de l'expression de PCNA au sein des noyaux des PTECs, à partir du J10, qui se maintient au J20. Par ailleurs, l'administration de L-Arg chez les souris AA n'a pas d'impact sur l'évolution de la prolifération cellulaire. Ces observations suggèrent un maintien de la capacité de régénération, comme précédemment observé dans notre laboratoire. Ces données concordent avec les résultats d'analyses obtenus dans d'autres études (Liu *et al*, 2003 ; Baudoux *et al*, 2012). Si on se réfère à la littérature, l'expression de PCNA disparaît lors de la phase chronique. En effet, lorsque les AA forment des adduits avec l'ADN, ceux-ci causent des défauts dans la réparation de l'ADN et par conséquent, interfèrent avec la prolifération cellulaire et influencent de manière négative la régénération des PTECs. Ce phénomène est à l'origine du développement de l'atrophie tubulaire (Pozdzik *et al*, 2008). Etant donné que nos résultats indiquent qu'une prolifération est toujours active, cette observation suggère la persistance de cellules non-endommagées au sein des tubules altérés et une limitation de l'atrophie tubulaire.

La suite de notre étude a pour but d'étudier les processus inflammatoires associés à ce modèle de NAA. Tout d'abord, nous avons évalué l'expression de l'IL-1 β dans les tissus rénaux. L'IL-1 β joue un rôle important en tant que cytokine pro-inflammatoire et est principalement sécrétée par les macrophages, mais aussi par d'autres types cellulaires tels que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales ou encore les fibroblastes (Weber *et al*, 2010). L'analyse de l'expression relative d'ARNm de l'IL-1 β chez les souris traitées aux AA nous montre une importante augmentation de cette expression au J20. Il est intéressant de noter qu'un apport en L-Arg chez les souris traitées aux AA a un impact en atténuant l'expression de l'ARNm codant pour l'IL-1 β . Ensuite, nous avons évalué l'expression de l'ARNm de l'IL-6 au sein du tissu rénal. Les résultats obtenus pour les souris intoxiquées aux AA nous montrent une expression d'ARNm assez importante au J5 qui diminue au J10 et 20. Un traitement à la L-Arg a pour effet de diminuer l'expression induite par une intoxication aux AA, surtout aux J5 et 10. Afin de poursuivre notre étude, nous nous sommes intéressés au rôle de MCP-1 dont l'expression est régulée par l'IL-1 β (Flory *et al*, 1995). Suite à une stimulation par des cytokines telles qu'IL-1 β ou à une exposition des protéines urinaires, les cellules épithéliales vont exprimer MCP-1. Par après, MCP-1 pourra être produite par les leucocytes infiltrant le milieu interstitiel. Comme son nom l'indique, MCP-1 est une chémokine qui a pour rôle de

5^{ème} jours du protocole, tandis que la phase chronique est caractérisée à partir du 7^{ème} jour jusqu'à la fin du protocole, le 35^{ème} jour (*Pozdzik et al, 2008*). En ce qui concerne les effets d'une administration en L-Arg sur la morphologie du tissu rénal, nous avons constaté qu'elle atténue les dommages causés par la NAA, comme l'attestent également les résultats obtenus par Kurus et al. (2005) dans un modèle de néphrotoxicité induit par la cyclosporine. En effet, les dommages tubulaires induits par des injections quotidiennes de cyclosporine (7,5 mg/kg) par voie sous-cutanée jusqu'au terme du protocole, étaient diminués suite à une administration de L-Arg (5 jours avant la première injection de cyclosporine et durant tout le protocole).

Les cellules tubulaires sont capables de se régénérer à la suite d'une atteinte toxique. En effet, lors de lésions rénales, les cellules intactes avoisinant les cellules nécrotiques, prolifèrent activement pour que l'intégrité des tubules puisse être maintenue et qu'il y ait une récupération des fonctions rénales (*Toback, 1992*). Dès lors, une analyse complémentaire visant à étudier le processus de régénération cellulaire a été effectuée grâce à un immunomarquage de PCNA qui est un co-facteur polymérase impliqué dans les processus de réparations des dommages à l'ADN (*Kelman, 1997*). Dans notre modèle, on remarque qu'une intoxication aux AA est à l'origine d'une augmentation de la régénération des cellules tubulaires via une stimulation importante de l'expression de PCNA au sein des noyaux des PTECs, à partir du J10, qui se maintient au J20. Par ailleurs, l'administration de L-Arg chez les souris AA n'a pas d'impact sur l'évolution de la prolifération cellulaire. Ces observations suggèrent un maintien de la capacité de régénération, comme précédemment observé dans notre laboratoire. Ces données concordent avec les résultats d'analyses obtenus dans d'autres études (*Liu et al, 2003 ; Baudoux et al, 2012*). Si on se réfère à la littérature, l'expression de PCNA disparaît lors de la phase chronique. En effet, lorsque les AA forment des adduits avec l'ADN, ceux-ci causent des défauts dans la réparation de l'ADN et par conséquent, interfèrent avec la prolifération cellulaire et influencent de manière négative la régénération des PTECs. Ce phénomène est à l'origine du développement de l'atrophie tubulaire (*Pozdzik et al, 2008*). Etant donné que nos résultats indiquent qu'une prolifération est toujours active, cette observation suggère la persistance de cellules non-endommagées au sein des tubules altérés et une limitation de l'atrophie tubulaire.

La suite de notre étude a pour but d'étudier les processus inflammatoires associés à ce modèle de NAA. Tout d'abord, nous avons évalué l'expression de l'IL-1 β dans les tissus rénaux. L'IL-1 β joue un rôle important en tant que cytokine pro-inflammatoire et est principalement sécrétée par les macrophages, mais aussi par d'autres types cellulaires tels que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales ou encore les fibroblastes (*Weber et al, 2010*). L'analyse de l'expression relative d'ARNm de l'IL-1 β chez les souris traitées aux AA nous montre une importante augmentation de cette expression au J20. Il est intéressant de noter qu'un apport en L-Arg chez les souris traitées aux AA a un impact en atténuant l'expression de l'ARNm codant pour l'IL-1 β . Ensuite, nous avons évalué l'expression de l'ARNm de l'IL-6 au sein du tissu rénal. Les résultats obtenus pour les souris intoxiquées aux AA nous montrent une expression d'ARNm assez importante au J5 qui diminue au J10 et 20. Un traitement à la L-Arg a pour effet de diminuer l'expression induite par une intoxication aux AA, surtout aux J5 et 10. Afin de poursuivre notre étude, nous nous sommes intéressés au rôle de MCP-1 dont l'expression est régulée par l'IL-1 β (*Flory et al, 1995*). Suite à une stimulation par des cytokines telles qu'IL-1 β ou à une exposition des protéines urinaires, les cellules épithéliales vont exprimer MCP-1. Par après, MCP-1 pourra être produite par les leucocytes infiltrant le milieu interstitiel. Comme son nom l'indique, MCP-1 est une chémokine qui a pour rôle de

recruter les monocytes/macrophages sur le site de l'inflammation et induit également la production d'IL-6 (*Viedt et Orth, 2002*). Les analyses visant à déterminer l'expression relative d'ARNm de MCP-1 nous montrent une faible expression de l'ARNm de cette chémokine au J5 chez les souris intoxiquées aux AA par rapport aux souris contrôles et cette expression augmente progressivement jusqu'à atteindre des valeurs significatives au J20. En ce qui concerne l'implication du NO, il a été précédemment montré que celui-ci régulait l'expression de MCP-1 en la diminuant par l'intermédiaire de la voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor-kappa B) (*Desai et al, 2003*). Néanmoins, aucune différence significative n'est détectable entre les deux groupes de souris intoxiquées aux AA dans notre protocole.

Afin de compléter les résultats que nous avons obtenus, nous avons entrepris de compter le nombre de macrophages localisés dans les reins des souris. Les résultats obtenus chez les souris traitées aux AA indiquent que le nombre de macrophages a tendance à augmenter au J5 pour ensuite atteindre un nombre important à partir du J10. Cette évolution se poursuit jusqu'au J20. Au vu de ces observations et du rôle que joue MCP-1, nous pouvons conclure que le nombre de macrophages observés à chaque timing concorde avec les résultats obtenus pour l'expression relative d'ARNm codant pour MCP-1. Dès lors, l'augmentation significative de l'expression relative d'ARNm de MCP-1 constatée au J20 serait responsable de l'importante infiltration des macrophages, eux-mêmes à l'origine de la production excessive d'IL-1 β observée simultanément. De plus, lorsque les souris traitées aux AA reçoivent un apport en L-Arg, le nombre de macrophages infiltrant le tissu rénal tend à diminuer mais seulement au J10. En effet, si l'on n'observe pas de réduction du nombre de macrophages suite à un apport en L-Arg au J20, il est possible que ce soit lié au fait que les macrophages ont également pour rôle de faciliter la réparation tissulaire (*Kluth et al, 2004*). Dès lors ceux-ci sont plus nombreux au J20 qu'au J10 chez les souris AA+L-Arg afin d'aider à restaurer l'intégrité du tissu.

Dans des études réalisées sur des rats recevant des injections quotidiennes de AA (10 mg/kg) pendant 5 ou 35 jours, il a été montré que l'infiltration leucocytaire concernait aussi bien des macrophages que des lymphocytes T CD4+ et CD8+ au sein du tissu rénal endommagé et cela bien avant l'apparition de la fibrose. En outre, ces cellules immunitaires persistaient dans le milieu interstitiel durant la phase chronique (*Pozdzik et al, 2008*). Cette même équipe de chercheurs ont d'ailleurs confirmé leurs résultats obtenus chez le rat en analysant des cas de patients NAA étant répertoriés dans la littérature. En effet, la majorité de ces cas met en évidence une inflammation interstitielle qui accompagne les processus de fibrose et d'atrophie tubulaire (*Pozdzik et al, 2010*). A partir de ces nombreuses études, il en a été déduit que l'inflammation joue un rôle majeur dans le développement de la fibrose marquant l'apparition de la phase chronique de la pathologie. En effet, les cellules immunitaires produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques dont le TGF- β qui promeut la fibrose par l'activation de la voie de signalisation Smad3 (*Zhou et al, 2010 ; Meng et al, 2015*).

Afin de poursuivre notre étude et d'analyser la réponse fibrotique, un immunomarquage de l' α SMA a été réalisé dans le but de déterminer la présence de myofibroblastes dans le rein étant donné que l' α SMA est exprimé par ce type de cellules. Les myofibroblastes sont connus pour être une source importante de matrice extracellulaire à l'origine du développement de la fibrose (*Lebleu et al, 2013*). La quantification de l' α SMA à partir des sections de reins des souris traitées aux AA indique une augmentation significative du pourcentage de surface positive pour l' α SMA dans le milieu interstitiel dès le 10^{ème} jour du protocole, maintenue

jusqu'au J20. Une forte expression de l' α SMA confirme l'accumulation d'un grand nombre de myofibroblastes dans le milieu interstitiel. Ceci concorde avec des analyses visant à déterminer les niveaux d'expression de l' α SMA chez des patients atteints de NAA. En effet, les analyses effectuées à partir d'une biopsie rénale réalisée sur les patients NAA ont mis en évidence une augmentation de l'expression de l' α SMA dans le milieu interstitiel (Yang et al, 2007 ; Pozdzik et al, 2010). Notre étude montre ensuite qu'un traitement à la L-Arg a pour effet de diminuer de manière significative le pourcentage de surface positive à l' α SMA jusqu'à atteindre des valeurs proches de celles des souris contrôles. Il est à noter que les reins de souris contrôles présentent un faible marquage d' α SMA qui ne correspond pas à des myofibroblastes mais à des vaisseaux sanguins. Par ailleurs, d'autres études montrent un marquage similaire des vaisseaux sanguins en conditions contrôles (Muchaneta-Kubara et El Nahas, 1997 ; Pozdzik et al, 2010). En fait, l' α SMA s'avère être l'isoforme de l'actine qui prédomine au sein des cellules musculaires lisses vasculaires (Cherng et al, 2008).

Enfin, la densité de la matrice extracellulaire a été analysée en évaluant le dépôt des fibres de Col I et III. Ces derniers composent la majorité de la matrice extracellulaire. En effet, l'activation de fibroblastes résidents en myofibroblastes est considérée comme la principale source de dépôt des fibres de collagène durant la NAA (Pozdzik et al, 2008) et il s'avère que ces myofibroblastes produisent des fibres de Col I et III. En revanche, les myofibroblastes issus de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) produisent principalement du collagène de type IV (Col IV) (Pozdzik et al, 2010). Nos analyses démontrent, dès le 5^{ème} jour après la première injection de AA, une légère augmentation de l'expression relative d'ARNm des fibres de Col I et III dans les reins des souris traitées aux AA par rapport aux souris contrôles. Au J10, cette expression d'ARNm est accrue pour les deux types tandis qu'au J20, seule l'expression relative d'ARNm du Col III continue à augmenter. Afin de vérifier les résultats que nous avons obtenus, les sections de reins ont été colorées au rouge picrosirius, un colorant mettant en évidence les fibres de Col I et III, ce qui a permis de confirmer les résultats obtenus pour l'expression relative d'ARNm. Les analyses de l'expression relative d'ARNm et la coloration au rouge picrosirius nous montrent qu'un traitement à la L-Arg apporte des effets bénéfiques en atténuant fortement la production des fibres de Col I et III induite par la toxicité des AA et ce, du J10 au J20. Les résultats obtenus à partir des souris ayant reçu un apport en L-Arg sont similaires à ceux obtenus au cours d'une étude réalisée sur des rats présentant une fibrose interstitielle suite à une obstruction urétérale unilatérale (Sun et al, 2012). Ces nombreuses observations sont cohérentes étant donné que le NO est connu pour inhiber la signalisation TGF- β /Smad (Saura et al, 2005).

3. Conclusion et perspectives

Au terme de cette discussion, nous pouvons en conclure qu'un traitement à base de L-Arg met en évidence certains effets prometteurs sur la polyurie et la diminution de l'osmolarité urinaire induites par l'intoxication aux AA et permet également d'atténuer les dommages tubulaires. En outre, les résultats obtenus nous montrent qu'un traitement à la L-Arg pourrait être utilisé comme outil thérapeutique pour limiter l'extension du processus de fibrose rénale mais pourrait également se révéler efficace à ce sujet dans d'autres organes tels que l'estomac ou le foie. Il serait intéressant d'augmenter la biodisponibilité du NO en administrant un donneur direct de NO car la L-Arg est impliquée dans d'autres voies de signalisation que celle du NO. Dès lors, l'apport qu'on fournit en L-Arg n'est pas entièrement utilisé par les NOS pour produire du NO, d'où l'intérêt d'administrer une substance qui libérerait directement du NO dans l'organisme.

La plupart des résultats obtenus au cours de ce mémoire, suggèrent l'apparition de l'insuffisance rénale aiguë au 5^{ème} jour du protocole, suivie du déclenchement des processus menant à l'apparition de la phase chronique au J20. Au vu des résultats obtenus, le J10 de notre protocole correspondrait au déclenchement de l'état chronique de la NAA. En effet, les résultats démontrent une augmentation de l'expression de l'ARNm de Col III qui s'avère être principalement produit lors de la phase précoce de la fibrose (*Kuncio et al, 1991*). De plus, la présence d'une régénération cellulaire nous permet d'en arriver à la même conclusion étant donné que lors de la phase chronique, il a été montré que le PCNA ne devait plus être exprimé suite à la formation des adduits AA-ADN (*Pozdzik et al, 2008*). Toutefois, la persistance de la prolifération cellulaire pourrait également expliquer l'amélioration des valeurs de créatininémie et d'urémie observés chez les souris traitées aux AA. Il serait donc intéressant de prolonger le protocole afin d'observer l'évolution de la pathologie au moins jusque 30 jours étant donné que *Pozdzik et al (2008)* ont marqué l'apparition d'une phase chronique après 35 jours d'injections de AA chez le rat.

En guise de perspectives, la caractérisation des modifications pouvant se produire dans le compartiment vasculaire dans la NAA reste un challenge. En effet, dans notre laboratoire, nous n'avons pas pu identifier des signes d'hypoxie dans le modèle de souris caractérisant la phase aiguë de la NAA, contrairement aux résultats qui ont été avancés par *Wen et ses collègues (2008)*. La dose administrée aux animaux dans cette étude (20 mg/kg AA pendant 4 ou 7 jours) pourrait expliquer cette différence de résultats. Il serait donc intéressant d'approfondir l'analyse d'une éventuelle phase hypoxique dans le modèle de souris NAA en se focalisant sur la phase chronique. Pour ce faire, on pourrait étudier l'intégrité des capillaires péri-tubulaires par un marquage immunohistochimique de l'isolectine-B4 ou CD31 et mettre en avant une hypoxie via des analyses immunohistochimiques et de qRT-PCR de VEGF et de HIF-1 α .

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Alam M.A., Kauter K., Withers K., Semia C. et Brown L. (2013). Chronic l-arginine treatment improves metabolic, cardiovascular and liver complications in diet-induced obesity in rats. *Food and Function*. 4: 83-91.
- Amoueian S. et Attaranzadeh A. (2012). Renal biopsy interpretation. *Topics in Renal Biopsy and Pathology*. 4: 45-64.
- Arlt V., Wiessler M., Heinz I. et Schmeiser H. (2000). Using polymerase arrest to detect DNA binding specificity of aristolochic acid in the mouse H-ras gene. *Carcinogenesis*. 21: 235-242.
- Arlt V.M., Alunni-Perret V., Quatrehomme G., Ohayon P., Albano L., Gaïd H., Michiels J.F., Meyrier A., Cassuto E., Wiessler M., Schmeiser H.H. et Cosyns J-P. (2004). Aristolochic acid (AA)-DNA adduct as marker of AA exposure and risk factor for AA nephropathy-associated cancer. *International journal of cancer*. 111: 977-980.
- Bakhiya N, Arlt V.M., Bahn A., Burckhardt G., Phillips D.H. et Glatt H. (2009). Molecular evidence for an involvement of organic anion transporters (OATs) in aristolochic acid nephropathy. *Toxicology*. 264: 74-79.
- Basile D.P., Anderson M.D. et Sutton T.A. (2012). Pathophysiology of acute kidney injury. *Comprehensive Physiology*. 2: 1303-1353.
- Baudoux T.E., Pozdzik A.A., Arlt V.M., De Prez E.G., Antoine M.H., Quellard N., Goujon J.M. et Nortier J.L. (2012). Probenecid prevents acute tubular necrosis in a mouse model of aristolochic acid nephropathy. *Kidney International*. 82: 1105-1113.
- Baylis C. (2008) Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *American journal of physiology. Renal physiology*. 294: F1-9.
- Baylis C. (2012). Nitric oxide synthase derangements and hypertension in kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 21: 1-6.
- Beckman J.S. et Koppenol W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *American journal of physiology*. 271: C1424-37.
- Birn H. et Christensen E.I. (2006). Renal albumin absorption in physiology and pathology. *International Society of Nephrology*. 69: 440-449.
- Blum M., Yachnin T., Wollman Y., Chernihovsky T., Peer G., Grosskopf I., Kaplan E., Silverberg D., Cabili S. et Iaina A. (1998). Low Nitric Oxide Production in Patients with Chronic Renal Failure. *Nephron*. 79: 265-268.
- Bode-Boger SM, Boger RH, Alfke H, Heinzl D, Tsikas D, Creutzig A, Alexander K et Frolich JC. (1996). L -Arginine induces nitric oxide-dependent vasodilation in patients with critical limb ischemia: a randomized, controlled study. *Circulation*. 93: 85-90.

Bonventre J.V. (2008). Pathophysiology of acute kidney injury. *Nephrology Rounds*. 6.

BIBLIOGRAPHIE

Bowman O.D. (2000) Renal pathophysiology. *Department of Biological and Physical Sciences*. Lecture 12.

Bradford G.H., Dranka B.P., Bailey S.M., Lancaster J.R. et Darley-Usmar V.M. (2010). What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *Journal of Biology Chemistry*. 285: 19699-19704.

Chan W. et Cai Z. (2008). Aristolochic acid induced changes in the metabolic profile of rat urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 46: 757-762.

Chawla L. et Kimmel P. (2012). Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney International*. 82: 516-524.

Chen T. (2007). Genotoxicity of aristolochic acid: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*. 15: 387-399.

Cherng S., Young J. et Ma H. (2008). Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA). *Journal of American Science*. 4: 7-9.

Choi Y., Chakraborty S., Nguyen V., Nguyen C., Kim B., Shim S., Suki W. et Truong L. (2000). Peritubular capillary loss is associated with chronic tubulointerstitial injury in human kidney: altered expression of vascular endothelial growth factor. *Human pathology*. 31: 1491-1497.

Cosyns J., Dehoux J., Guiot Y., Goebbels R., Robert A., Bernard A. et Van Ypersele De Strihou C. (2001). Chronic aristolochic acid toxicity in rabbits: A model of Chinese herbs nephropathy? *Kidney International*. 59: 2164-2173.

Csonka C., Páli T., Bencsik P., Görbe A., Ferdinandy P., Csont T. et Csonka C. (2014). Measurement of NO in biological samples. *British Journal of Pharmacology*. 172: 1620-1632.

Cui M., Liu Z-H., Qiu Q., Li H. et Li L-S. (2005). Tumour induction in rats following exposure to short-term high dose aristolochic acid I. *Mutagenesis*. 20: 45-49.

Debelle F.D., Nortier J.L., De Prez E.G., Garbar C.H., Vienne A.R., Salmon I.J., Deschodt-Lanckman M.M. et Vanherweghem J.L. (2002). Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. *Journal of the American Society of Nephrology*. 13: 431-436.

Debelle F.D., Vanherweghem J.L. et Nortier J.L. (2008). Aristolochic acid nephropathy: a worldwide problem. *Kidney International*. 74: 158-169.

Debelle F.D., Vanherweghem J.L. et Nortier J.L. (2009). Néphropathie aux acides aristolochiques: de l'observation clinique au modèle expérimentale. *Flammarion Médecine-Sciences-Actualité Néphrologique*. 188-200.

BIBLIOGRAPHIE

- Declèves A-E., Jadot I., Colombaro V., Martin B., Voisin V., Habsch I., De Prez E., Nortier J. et Caron N. (2015). Protective effect of nitric oxide in aristolochic acid-induced toxic acute kidney injury. An old friend with new assets. *Experimental Physiology*. 000.0: 1-14.
- Denninger J.W. et Marletta M.A. (1999). Guanylate cyclase and the NO/cGMP signalling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1411: 334-350.
- Depierreux M., Van Damme B., Vanden Houte K., et Vanherweghem. (1994). Pathologic aspects of a newly described nephropathy related to the prolonged use of Chinese herbs. *American journal of kidney diseases*. 24: 172- 180.
- Desai A., Miller M.J., Huang X. et Warren J.S. (2003). Nitric Oxide Modulates MCP-1 Expression in Endothelial Cells: Implications for the Pathogenesis of Pulmonary Granulomatous Vasculitis. *Inflammation*. 27: 213-223.
- Dickman K.G., Sweet D.H., Bonala R., Ray T. et Wu A. (2011). Physiological and molecular characterization of aristolochic acid transport by the kidney. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 338: 588-597.
- Dunn S., Qi Z., Bottinger E., Breyer M. et Sharma K. (2004). Utility of endogenous creatinine clearance as a measure of renal function in mice. *Kidney International*. 65: 1959-1967.
- Flory C.M., Jones M.L., Miller B.F. et Warren J.S. (1995). Regulatory roles of tumor necrosis factor- α and interleukin- 1β in monocyte chemoattractant protein-1-mediated pulmonary granuloma formation in the rat. *American Journal of Pathology*. 146: 450-462.
- Förstermann U. et Sessa W.C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 33: 829-837.
- Gökmen M.R., Cosyns J-P., Arlt V.M., Stiborová M., Phillips D.H., Schmeiser H.H., Simmonds M., Cook T., Vanherweghem L., Nortier J.L., et Lord G.M. (2013). The Epidemiology, Diagnosis, and Management of Aristolochic Acid Nephropathy. *Annals of Internal Medicine*. 158: 469-477.
- Grollman A. (2013). Aristolochic acid nephropathy: Harbinger of a global iatrogenic disease. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 54: 1-7.
- Hranjec T., Kovac A., Kos J., Mao W., Chen J., Grollman A. et Jelaković B. (2005). Endemic nephropathy: the case for chronic poisoning by aristolochia. *Croatian medical journal*. 46: 116-125.
- Hill B.G., Dranka B.P., Bailey S.M., Lancaster J.R. et Darley-Usmar V.M. (2010). What Part of NO Don't You Understand? Some Answers to the Cardinal Questions in Nitric Oxide Biology. *Journal of Biological Chemistry*. 285: 19699-19704.

BIBLIOGRAPHIE

- Huang L., Scarpellini A., Funck M., Verderio E. et Johnson T.S. (2013). Development of a Chronic Kidney Disease Model in C57BL/6 Mice with Relevance to Human Pathology. *Nephron Extra*. 3: 12-29.
- Jelaković B., Karanović S., Vuković-Lela I., Miller F., Edwards K., Nikolić J., Tomić K., Slade N., Brdar B., Turesky R., Stipančić Ž., Dittrich D., Grollman A. et Dickman K. (2012). Aristolactam-DNA adducts are a biomarker of environmental exposure to aristolochic acid. *Kidney International*. 81: 559-567.
- Kabanda A., Jadoul M., Lauwerys R., Bernard A., Van C. et De Strihou Y. (1995). Low molecular weight proteinuria in Chinese herbs nephropathy. *Kidney International*. 48: 1571-1576.
- Kang D-H., Nakagawa T., Feng L. et Johnson R.J. (2002). Nitric Oxide Modulates Vascular Disease in the Remnant Kidney Model. *American Journal of Pathology*. 161: 239-248.
- Kelman Z. (1997). PCNA: Structure, functions and interactions. *Oncogene*. 14: 629-640.
- Klahr S. (2001). The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression. *Nephrology, dialysis, transplantation*. 16: 60-62.
- Klahr S. et Morrissey J. (2004). L-arginine as a therapeutic tool in kidney disease. *Seminars in Nephrology*. 24: 389-394.
- Kluth D.C., Erwig L-P. et Rees A.J. (2004). Multiple facets of macrophages in renal injury. *Kidney International*. 66: 542-557.
- Kone B. (2004). Nitric oxide synthesis in the kidney: Isoforms, biosynthesis, and functions in health. *Seminars in Nephrology*. 24: 299-315.
- Kubes P., Suzuki M., et Granger D. (1991). Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88: 4651-4655.
- Kuncio G.S., Neilson E.G. et Haverty T. (1991). Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney International*. 39: 550-556.
- Kuruş M., Eşrefoğlu M., Bay A. et Oztürk F. (2005). Protective effect of oral L-arginine supplementation on cyclosporine induced nephropathy in rats. *International urology and nephrology*. 37: 587-594.
- Lacour B. (2013). Physiologie du rein et bases physiopathologiques des maladies rénales. *Revue Francophone des Laboratoires*. 451: 25-37.
- Leask A. et Abraham D.J. (2004). TGF- β signaling and the fibrotic response. *FASEB journal*. 18: 816-827.

BIBLIOGRAPHIE

- Lebeau C. (2006). Néphrotoxicité des acides aristolochiques : approches expérimentales de l'atteinte tubulaire proximale. Thèse présentée en vue de l'obtention du titre de docteur en sciences biomédicales, Faculté de Médecine.
- Lebeau C., Debelle F.D., Arlt V.M., Pozdzik A.A., De Prez E.G., Phillips D.H., Deschodt Lanckman M.M., Vanherweghem J.L. et Nortier J.L. (2005). Early proximal tubule injury in experimental aristolochic acid nephropathy: functional and histological studies. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 20: 2321-2332.
- Lebleu V.S., Taduri G., O'Connell J., Teng Y., Cooke V.G., Woda C., Sugimoto H. et Kalluri R. (2013). Origine and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nature Medicine*. 19: 1047-1053.
- Lin H., Smith M.J. Jr et Young D.B. (1996). Roles of prostaglandins and nitric oxide in the effect of endothelin-1 on renal hemodynamics. *Hypertension*. 28: 372-378.
- Liu M.C., Maruyama S., Mizuno M., Morita Y., Hanaki S., Yuzawa Y. et Matsuo S. (2003). The nephrotoxicity of Aristolochia manshuriensis in rats is attributable to its aristolochic acids. *Journal of Clinical and Experimental Nephrology*. 7: 186-194.
- Lord G., Hollstein M., Arlt V., Roufosse C., Pusey C., Cook T. et Schmeiser H. (2004). DNA adducts and p53 mutations in a patient with aristolochic acid-associated nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*. 43: e11-7.
- Mansour M., Daba M.H., Gado A., Al-Rikabi A. et Al-Majed A. (2002). Protective effect of L-Arginine against nephrotoxicity induced by cyclosporine in normal rats. *Pharmacological Research*. 45: 441-446.
- Marieb E.N. et Hoehn K. (2013). Anatomie et physiologie humaine. *Pearson*. 9^{ème} édition : 1127-1137.
- Mayer G. (2011). Capillary rarefaction, hypoxia, VEGF and angiogenesis in chronic renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 26: 1132-1137.
- Meng X-M., Tang P.M., Li J. et Lan H.Y. (2015). TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Frontiers in Physiology*. 6: 82.
- Mengs U., Lang W. et Poch J.A. (1982). The carcinogenic action of aristolochic acid in rats. *Archives of Toxicology*. 51: 107-119.
- Mount P. et Power D. (2006). Nitric oxide in the kidney: Functions and regulation of synthesis. *Acta Physiologica*. 187: 433-446.
- Muchaneta-Kubara E.C. et El Nahas A.M. (1997). Myofibroblast phenotypes expression in experimental renal scarring. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 12: 904-915.

- Nesher N., Frolkis I., Schwartz D., Chernichovski T., Levi S., Pri-Paz Y., Chernin G., Shtabsky A., Ben-Gal Y., Paz Y. et Schwartz I. (2013). L -Arginine improves endothelial function, independently of arginine uptake, in aortas from chronic renal failure female rats. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*. 306: 449-456.
- Nortier J.L., Deschodt-Lanckman M.M., Simon S., Thielemans N.O., de Prez E.G., Depierreux M.F., Tielemans C.L., Richard C., Lauwerys R.R., Bernard A.M. et Vanherweghem J.L. (1997). Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy: monitoring by neutral endopeptidase enzymuria. *Kidney International*. 51: 288-293.
- Nortier J.L. et Vanherweghem J.L. (2002). Renal interstitial fibrosis and urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herbs (*Aristolochia fangchi*). *Toxicology*. 181-182: 577-580.
- Nortier J., Schmeiser H., Muniz Martinez M., Arlt V., Vervaeke C., Garbar C., Daelemans P. et Vanherweghem J. (2013). Invasive urothelial carcinoma after exposure to Chinese herbal medicine containing aristolochic acid may occur without severe renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 18: 426-428.
- Papapetropoulos A., García-Cardena G., Madri J. et Sessa W. (1997). Nitric Oxide Production Contributes to the Angiogenic Properties of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Endothelial Cells. *The Journal of clinical investigation*. 100: 3131-3139.
- Peters G. et Hedwall P.R. (1963). aristolochic acid intoxication: a new type of impairment of urinary concentrating ability. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*. 145: 334-355.
- Pozdzik A.A., Salmon I.J., DeBelle F.D., Decaestecker C., Van den Branden C., Verbeelen D., Deschodt-Lanckman M.M., Vanherweghem J.L. et Nortier J.L. (2008). Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation. *Kidney International*. 73: 595-607.
- Pozdzik A.A., Salmon I.J., Husson C.P., Decaestecker C., Rogier E., Bourgeade M.F., Deschodt-Lanckman M.M., Vanherweghem J.L. et Nortier J.L. (2008). Patterns of Interstitial inflammation during the evolution of renal injury in experimental aristolochic acid nephropathy. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 23: 2480-2491.
- Pozdzik A., Berton A., Schmeiser H.H., Missoum W., Decaestecker C., Salmon I.J., Vanherweghem J-L. et Nortier J.L. (2010). Aristolochic acid nephropathy revisited: a place for innate and adaptive immunity? *Histopathology*. 56: 449-463.
- Raven P., Johnson G., Losos J et Singer S. (2007). Biologie. De Boeck Université. 7^{ème} édition : 1052-1060.
- Reginster F., Jadoul M. et van Ypersele de Strihou C. (1997). Chinese herbs nephropathy presentation, natural history and fate after transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 12: 81-86.

- Saracyn M., Ząbkowski T., Zdanowski R., Brytan M., Patera J., Nowak Z., Kade G. et Wańkiewicz Z. (2014). Effect of nitric oxide pathway regulation on water/sodium balance and renal function in a rodent model of acute liver and renal failure. *Medical science monitor*. 20: 1735-1744.
- Sato N., Takahashi D., Chen S.M., Tsuchiya R., Mukoyama T., Yamagata S., Ogawa M., Yoshida M., Kondo S., Satoh N. et Ueda S. (2004). Acute nephrotoxicity of aristolochic acids in mice. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 56: 221-229.
- Saura M., Zaragoza C., Herranz B., Grieria M., Diez-Marqués L., Rodriguez-Puyol D. et Rodriguez-Puyol M. (2005). Nitric Oxide Regulates Transforming Growth Factor- β Signaling in Endothelial Cells. *Circulation Research*. 97: 1115-1123.
- Schmeiser H.H., Bieler C.A., Wiessier M., Van Ypersele de Strihou C. et Cosyns J-P. (1996). Detection of DNA adducts formed by aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese herbs nephropathy. *Cancer Research*. 56: 2025-2028.
- Schneider R., Raff U., Vornberger N., Schmidt M., Freund R., Reber M., Schramm L., Gambaryan S., Wanner C., Schmidt H. et Galle J. (2003). L-arginine counteracts nitric oxide deficiency and improves the recovery phase of ischemic acute renal failure in rats. *Kidney International*. 64: 216-225.
- Schramm L., LA M., Heidbreder E., Hecker M., Beckman JS., Lopau K., Zimmermann J., Rendl J., Reiners C., Winderl S., Wanner C. et Schmidt H. (2003). L -Arginine deficiency and supplementation in experimental acute renal failure and in human kidney transplantation. *Kidney International*. 61: 1423-1432.
- Sharma S.P. (2004). Nitric oxide and the kidney. *Indian Journal of Nephrology*. 14: 77-84.
- Shibutani S., Dong H., Suzuki N., Ueda S., Miller F. et Grollman A.P. (2007). Selective toxicity of aristolochic acids I and II. *Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals*. 35: 1217-1222.
- Silverthorn D.U., Ober W.C., Garrison C.W., Silverthorn A.C. et Johnson B.R. (2007). Physiologie humaine, une approche intégrée. *Pearson Education*. 4^{ème} Edition: 582-629.
- Slade N., Moll U., Brdar B., Zorić A. et Jelaković B. (2009). p53 mutations as fingerprints for aristolochic acid - an environmental carcinogen in endemic (Balkan) nephropathy. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 663: 1-6.
- Stefanovic V., Toncheva D., Atanasova S. et Polenakovic M. (2006). Etiology of Balkan Endemic Nephropathy and Associated Urothelial Cancer. *American Journal of Nephrology*. 26: 1-11.

BIBLIOGRAPHIE

- Stiborová M., Frei E. et Schmeiser H. (2008). Biotransformation enzymes in development of renal injury and urothelial cancer caused by aristolochic acid. *Kidney international*. 1: 8-12.
- Sun D., Feng J., Dai C., Sun L., Jin T., Ma J. et Wang L. (2006). Role of peritubular capillary loss and hypoxia in progressive tubulointerstitial fibrosis in a rat model of aristolochic acid nephropathy. *American Journal of Nephrology*. 26: 363-371.
- Sun D., Wang Y., Liu C., Zhou X., Li X. et Xiao A. (2012). Effects of nitric oxide on renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Life Sciences*. 90: 900-909.
- Toback F.G. (1992). Regeneration after acute tubular necrosis. *Kidney International*. 41: 226-246.
- Underbakke E.S., Iavarone A.T., Chalmers M.J., Pascal B.D., Novick S., Griffin P.R. et Marletta M.A. (2014). Nitric oxide-induced conformational changes in soluble guanylate cyclase. *Structure*. 22: 602-611.
- U.S. Department of health and human services, Public health service. (2011). Report on carcinogens: aristolochic acids. National Toxicology Program. 12^{ème} Edition: 45-49.
- Valtin H. (1983). Renal Function, Mechanisms preserving fluid and solute balance in health. Little. Brown and Company. 2^{ème} édition: 1-22.
- Vander A.J. (1995). Renal physiology. McGraw-Hill Health Professions Division. 5^{ème} édition: 1-22.
- Vanherweghem J.L. (2002). Urémie chronique et cancer des voies urinaires secondaires à la prise d'extraits végétaux utilisés en phytothérapie chinoise. *Médecine/Sciences*. 18: 1095-1101.
- Viedt C. et Orth S.R. (2002). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the kidney: does it more than simply attract monocytes? *Nephrology, Dialysis, Transplant*. 17: 2043-2047.
- Weber A., Wasiliew P. et Kracht M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Science Signaling*. 3: cm1.
- Wen Y.J., Qu L. et Li X.M. (2008). Ischemic injury underlies the pathogenesis of aristolochic acid-induced acute kidney injury. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 152: 38-46.
- Xue X., Gong L., Maeda K., Luan Y., Qi X., Sugiyama Y. et Ren J. (2011). Critical Role of Organic Anion Transporters 1 and 3 in Kidney Accumulation and Toxicity of Aristolochic Acid I. *Molecular Pharmaceutics*. 8: 2183-2192.

0705-51-51

BIBLIOGRAPHIE

- Yang L., Li X. et Wang H. (2007). Possible mechanisms explaining the tendency towards interstitial fibrosis in aristolochic acid-induced acute tubular necrosis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 22: 445-456.
- Zamora R., Vodovotz Y. et Billiar T.R. (2000). Inducible Nitric Oxide Synthase and Inflammatory Diseases. *Molecular Medicine*. 6: 347-373.
- Zeisberg M. et Kalluri R. (2004). The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *Journal of Molecular Medicine*. 82: 175-181.
- Zeisher A.M., Fisslthaler B., Schray-Utz B. et Busse R. (1995). Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circulation Research*. 76: 980-986.
- Zhou L., Fu P., Huang X., Liu F., Chung A., Lai K. et Lan H. (2010). Mechanism of chronic aristolochic acid nephropathy: role of Smad3. *American Journal of Physiology. Renal physiology*. 298: F1006-F1017.